

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS



TESIS DOCTORAL

**Análisis preclínico de compuestos con capacidad antitumoral
en cáncer urotelial**

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR

PRESENTADA POR

Carolina Rubio Martín

Directores

Jesús M. Paramio González
Marta G. Dueñas Porto

Madrid

© Carolina Rubio Martín, 2019



UNIVERSIDAD
COMPLUTENSE
MADRID

T41529

**DECLARACIÓN DE AUTORÍA Y ORIGINALIDAD DE LA TESIS
PRESENTADA PARA OBTENER EL TÍTULO DE DOCTOR**

D./Dña. CAROLINA RUBIO,
estudiante en el Programa de Doctorado BIOQUIMICA, BIOLOGIA MOL Y BIOMEDICIN,
de la Facultad de Ciencias Químicas de la Universidad Complutense de
Madrid, como autor/a de la tesis presentada para la obtención del título de Doctor y
titulada:

ANÁLISIS PRECLÍNICO DE COMPUESTO CON CAPACIDAD ANTITUMORAL EN CANCER UROTELIAL

y dirigida por: JESUS Mª PARAMIO GONZÁLEZ Y MARTA G. DUEÑAS PORTO

DECLARO QUE:

La tesis es una obra original que no infringe los derechos de propiedad intelectual ni los derechos de propiedad industrial u otros, de acuerdo con el ordenamiento jurídico vigente, en particular, la Ley de Propiedad Intelectual (R.D. legislativo 1/1996, de 12 de abril, por el que se aprueba el texto refundido de la Ley de Propiedad Intelectual, modificado por la Ley 2/2019, de 1 de marzo, regularizando, aclarando y armonizando las disposiciones legales vigentes sobre la materia), en particular, las disposiciones referidas al derecho de cita.

Del mismo modo, asumo frente a la Universidad cualquier responsabilidad que pudiera derivarse de la autoría o falta de originalidad del contenido de la tesis presentada de conformidad con el ordenamiento jurídico vigente.

En Madrid, a 10 de julio de 2019

Fdo.: 

Esta DECLARACIÓN DE AUTORÍA Y ORIGINALIDAD debe ser insertada en
la primera página de la tesis presentada para la obtención del título de Doctor.

Universidad Complutense de Madrid

Facultad de Ciencias Químicas

Departamento de Bioquímica y Biología Molecular



**UNIVERSIDAD
COMPLUTENSE
MADRID**

TESIS DOCTORAL

**ANÁLISIS PRECLÍNICO DE COMPUESTOS CON CAPACIDAD
ANTITUMORAL EN CÁNCER UROTELIAL**

Carolina Rubio Martín

Madrid, 2019

Universidad Complutense de Madrid
Facultad de Ciencias Químicas
Departamento de Bioquímica y Biología Molecular



**UNIVERSIDAD
COMPLUTENSE
MADRID**

TESIS DOCTORAL

**ANÁLISIS PRECLÍNICO DE COMPUESTOS CON CAPACIDAD
ANTITUMORAL EN CÁNCER UROTELIAL**

Memoria presentada por Carolina Rubio Martín para optar al Grado de Doctor por la Universidad Complutense de Madrid.

El trabajo experimental recogido en esta memoria ha sido realizado en la Unidad Mixta de Oncología Molecular del Centro de Investigaciones Energéticas, Medioambientales y Tecnológicas (CIEMAT)-Oncología Molecular y Celular del Instituto de Investigación Biomédica del Hospital Universitario "12 de Octubre" bajo la dirección del Doctor Jesús María Paramio González y la Doctora Marta Gloria Dueñas Porto.

Director de la tesis Doctoral:

Dr. Jesús María Paramio González

Dr. Marta Gloria Dueñas Porto.

Carolina Rubio Martín
Madrid, 2019

A mi familia

A Daniel

A la memoria de mis abuelos

«La ciencia no sólo es una disciplina de la razón, sino también del romance y de la pasión»

Stephen Hawking

Agradecimientos

Esta tesis doctoral va dedicada a todas aquellas personas que a lo largo de estos años han contribuido a que este trabajo haya sido posible, tanto a nivel científico como personal. En primer lugar, quisiera agradecer a mis directores de tesis su esfuerzo y dedicación. Jesús y Marta, gracias. Empezar una tesis doctoral siempre supone un reto y, de forma añadida, yo me enfrente a un cambio radical. Sin vuestra ayuda y apoyo no lo habría logrado. Gracias por transmitirme vuestros conocimientos, por enseñarme todo lo que se, por aguantar mis preguntas constantes, por valorar siempre mis opiniones e iniciativas, por confiar en mí y hacerme sentir uno más del equipo. Ha sido un placer realizar este trabajo mano a mano y espero que no sea el último.

Gracias a todos los miembros de la Unidad Mixta de Oncología Molecular del Centro de Investigaciones Energéticas, Medioambientales y Tecnológicas (CIEMAT)-Oncología Molecular y Celular del Instituto de Investigación Biomédica del Hospital Universitario “12 de Octubre”. Por brindarme su ayuda siempre que la he necesitado. A todo el personal del animalario y a todas las chicas del animalario. Sin su labor esta tesis no hubiera sido posible.

Agradecer también a Janssen y Pfizer ya que sin su financiación no hubiera sido posible el desarrollo de este trabajo.

Índice

Abreviaturas	1
Summary	3
Resumen	7
Introducción	11
1. Cáncer de Vejiga	11
1.1. Características Clínico-patológicas de tumores uroteliales	12
1.1.1. Tumores superficiales de vejiga.	12
1.1.2. Tumores infiltrantes de vejiga.	14
1.1.3. Otras clasificaciones de tumores de vejiga.	15
1.2. Tratamientos del cáncer de vejiga.	15
2. Ciclo celular: control y regulación	19
2.1. Regulación del ciclo celular	21
2.1.1. Puntos de control del ciclo celular.	21
2.1.2. Ciclinas, CDKs y CKIs.	22
3. CDK4-6 ciclo celular y regulación	24
3.1. Regulación de la actividad de CDK4	24
4. RB, FOXM1, dianas de CDK4-ciclina D	26
4.1. Proteína del Retinoblastoma (RB)	26
4.2. FOXM1	27
5. RB, CDK4/6 y FOXM1 en cáncer	28
5.1. Proteína del Retinoblastoma (RB)	28
5.2. CDK4/6	28
6. Inhibidores de CDK4/6	30
Objetivos	34
Materiales y métodos	35
1. Recolección de muestras	35
1.1. Muestras humanas	35
1.2. Muestras de ratón	36
1.2.1. Para el análisis histológico.	36

Índice

1.2.2. Para la extracción de proteínas.....	37
1.2.3. Para la extracción de RNA.....	37
2. Líneas celulares y medios de cultivo.....	37
3. Agentes farmacológicos	38
4. Ensayo de citotoxicidad	38
5. Plásmidos y vectores	39
5.1. Plásmidos y vectores lentivirales utilizados.....	39
5.2. Generación de vectores lentivirales	40
5.3. Transfección/infección de líneas celulares.	41
6. Análisis de distribución del ciclo celular	41
7. Análisis Inmunohistoquímico.	42
8. Extracción de proteína y análisis mediante western blot.	43
9. Extracción de ARN y RT-PCR cuantitativa.....	46
10. Análisis masivo de expresión génica.	48
11. Experimentación animal.....	49
11.1. Xenoinjertos en flanco.	49
11.2. Modelo CKO.....	50
12. Análisis Estadístico.....	51
12.1. Tratamiento de los datos y análisis bioinformáticos de los “microarrays” de expresión.....	51
Resultados.....	53
1. Estudio del efecto de palbociclib en líneas celulares de cáncer de vejiga.....	53
1.1. Estudio de la sensibilidad de las diferentes líneas celulares a palbociclib.....	53
1.2. Efecto de palbociclib sobre el ciclo celular.....	56
1.3. Estudio de las alteraciones producidas en la vía de señalización de CDK4/6 tras el empleo de palbociclib.	58
1.4. Papel antitumoral de palbociclib en tumores generados mediante xenoinjerto de líneas celulares de cáncer de vejiga en ratones inmunodeficientes.....	60
2. FOXM1 actúa como diana de la inhibición de CDK4 /6.....	63
2.1. Análisis transcriptómico de las líneas celulares de cáncer de vejiga tratadas con palbociclib.....	63
2.2. Identificación de FOXM1 como mediador de la respuesta a palbociclib.	66
2.3. Estudio de la sensibilidad a palbociclib dependiente de FOXM1.....	69

3. Importancia de FOXM1 en el cáncer de vejiga.....	72
3.1. Los niveles de FOXM1 predicen la recurrencia en el cáncer de vejiga.....	72
4. Utilización de palbociclib junto con el quimioterápico cisplatino.....	78
4.1. Efecto de la terapia combinada de palbociclib con cisplatino sobre la supervivencia celular en líneas celulares de cáncer de vejiga.....	78
4.2. Implicación de la expresión de FOXM1 y CDK4 en la sensibilidad a cisplatino.....	80
4.3. Papel de FOXM1 en la acción combinada de palbociclib y cisplatino.....	81
4.4. Efecto de la combinación de palbociclib y cisplatino <i>in vivo</i> en un modelo de xenoinjerto de líneas celulares de cáncer de vejiga.....	82
5. Empleo de palbociclib en combinación con cisplatino en un modelo de ratón inmunocompetente de cáncer de vejiga metastásico.....	86
5.1. Caracterización del ratón <i>Rb1^{FF}, Pten^{FF}, Trp53^{FF} y Rbl1^{-/-}</i> como modelo de cáncer de vejiga metastásico.....	86
5.2. Caracterización comparativa de los tumores uroteliales generados en el modelo de ratón CKO con el CU humano.....	90
5.3. Caracterización de los tumores uroteliales generados en el modelo de ratón CKO tratados con palbociclib y cisplatino.....	94
Discusión	103
1. Efecto de palbociclib en líneas de cáncer de vejiga.....	103
2. FOXM1 actúa como diana de la inhibición de CDK4 /6.....	106
3. Importancia de FOXM1 en el cáncer de vejiga.....	107
4. Utilización de palbociclib junto con el quimioterápico cisplatino.....	109
5. Empleo de palbociclib en combinación con cisplatino en un modelo de ratón de cáncer de vejiga metastásico inmunocompetente.....	111
Conclusiones.....	117
Referencias	118
Anexos	137

Abreviaturas

ADN	Ácido desoxirribonucleico
ADNc	ADN complementario
ARF	<i>"Alternative reading frame"</i>
ARN	Ácido ribonucleico
ARNm	Ácido ribonucleico mensajero
ATCC	<i>"American Type Culture Collection"</i>
BCG	<i>Bacillus Calmette Guerin</i>
BrdU	Bromodesoxiuridina
CCT	Carcinoma de células transicionales
CDDP	Cisplatino
CDK	Quinasa dependiente de ciclina (<i>"Cyclin-dependent kinase"</i>)
CIEMAT	Centro de Investigaciones Energéticas, Medioambientales y Tecnológicas
CIS	Carcinoma plano <i>"in situ"</i>
CKI	Inhibidores de CDK (<i>"Cyclin dependent kinase inhibitors"</i>)
CKO	Cuádruple <i>"Knock Out"</i>
CMV	Citomegalovirus
CNIO	Centro Nacional de Investigaciones Oncológicas
CPCP	Cáncer de pulmón de células pequeñas
CU	Cáncer urotelial
CUMI	Carcinoma urotelial músculo invasivo
CUNMI	Carcinoma urotelial no músculo invasivo
CV	Cáncer de vejiga
DAPI	4',6-diamino-2-fenilindol
EAU	Asociación Europea de Urología
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético
EGTA	Ácido etilenglicol bis (β -amino etil éter) tetraacético
ER	Receptor de Estrógenos (<i>"Estrongen Receptor"</i>)
FDA	<i>"Food and Drug Administration"</i>
G1	GAP 1
G2	GAP 2
GCCN	<i>"Guanine Cytosine Count Normalization"</i>
GEO	<i>"Gene Expression Omnibus"</i>
GFP	Proteína verde fluorescente (<i>"Green fluorescent protein"</i>)
GSEA	<i>"Gene Set Enrichment Analysis"</i>
HDAC	Histona deacetilasa
HR+	Receptor Hormonal Positivo (<i>"Hormone Receptor Positive"</i>)
IC50	Concentración inhibitoria al 50 %
ISUP	Sociedad Internacional de Patología Urológica (<i>"International Society of Urological Pathology"</i>)
K5	Queratina 5
LLA	Leucemia linfoblástica aguda
M	Mitosis/meiosis
MOI	Multiplicidad de Infección (<i>"Multiplicity of infection"</i>)

Abreviaturas

MOPS	ácido 3-morfolino propanosulfónico (<i>"3-(N-morpholino)propanesulfonic acid"</i>)
MUT	Mutado, o con mutación
MVAC	Methotrexate Vinblastina Adriamicina Cisplatino
NIHGC	Carcinoma urotelial papilar no invasivo de alto grado (<i>"Noninvasive papillary urothelial carcinoma high-grade"</i>)
NILGC	Carcinoma urotelial papilar no invasivo de bajo grado (<i>"Noninvasive papillary urothelial carcinoma low-grade"</i>)
OMS	Organización Mundial de la Salud
PBS	Tampón fosfato salino (<i>"Phosphate buffered saline"</i>)
PD1	Proteína de muerte celular programada (<i>"Programmed Death-1"</i>)
PDL1	Ligando 1 de muerte programada (<i>"Programmed Death-ligand 1"</i>)
PE	Ficoeritrina (<i>"Phycoerythrin"</i>)
pH	Potencial de hidrógenos
pH3	Histona 3 fosforilada Ser 10
PMSF	Fluoruro de fenilmetilsulfonilo
PUNLMP	Neoplasias uroteliales papilares de bajo potencial maligno (<i>"Papillary urothelial neoplasm of low malignant potential"</i>)
RB	Retinoblastoma
RMA	<i>"Robust Multi-Array Average"</i>
RPPA	<i>"Reverse Phase Protein Array"</i>
RT-PCR	<i>"Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction"</i>
RTU	Resección transuretral
SD	Desviación típica
SDS	Dodecilsulfato sódico
SEM	Error estándar de la media
shARN	<i>"Small hairpin RNA"</i>
SST	<i>"Signal Space Transformation"</i>
TAC	<i>"Transcriptome analysis console"</i>
TAD	Dominio de trans-activación
TAE	Tris-acetato-EDTA
TBE	Tris-borato-EDTA
TCGA	<i>"The Cancer Genome Atlas"</i>
TE	Tris-EDTA
TEM	Transición epitelio mesénquima
Tis	Carcinoma plano no invasivo
TMA	<i>"Tissue microarray"</i>
TNM	Tumor Nodo Metástasis
WT	Estado nativo (<i>"Wild type"</i>)

Summary

Preclinical analysis of compounds with anti-tumor capacity in urothelial cancer

Introduction

Urothelial cancer is the ninth most common cancer worldwide and represents the second most frequent tumor of the genitourinary system, affecting 430,000 people per year and resulting in more than 165,000 deaths annually. Covering 90% of the cases, transitional cell carcinoma (TCC) is the most common bladder tumor type. At diagnosis, approximately 70% of the TCCs are non-muscle invasive urothelial carcinomas (NMIUC) whereas the other 30% represent muscle-invasive urothelial carcinomas (MIUC). Even though both carcinoma types originate from the urothelium, they show different clinical characteristics. NMIUC shows a favorable prognosis, but displays a high recurrence incidence (50-70 %) with tumor progression towards invasive tumors in approximately 15% of the cases. With respect to MIUC, frequent metastatic spreading is an important problem resulting in poor prognosis with very low 5-year survival rates (lower than 6%) from the moment of diagnosis. Standard treatment of NMIUC consists of transurethral resection (TUR) of tumor, regularly or commonly followed by adjuvant intravesical chemotherapy or immunotherapy. For MIUC, additional to conventional chemotherapy (gemcitabine and cisplatin) and radical surgery (cystectomy), no therapeutic improvements have been developed since 1970, with the exception of immune checkpoint inhibitors proposed very recently. Consequently, we face two important challenges in the management of urothelial carcinoma: first, the identification and characterization of predictive biomarkers of the tumor evolution for NMIUC, and second, the development of new efficient and personalized therapies based on the characteristics of the primary tumor for MIUC. Accordingly, detailed knowledge on the different tumor subtypes and possible

Summary

evolution/progression of these subtypes is essential, as well as the availability of predictive biomarkers of response to a widespread battery of specific treatments.

Objective

The main objective of this project is to provide the scientific support the basis for a new therapeutic approach in urothelial cancer. The hypothesis of this work is the use of a CDK4/6 inhibitor, palbociclib, in combination with the currently used cisplatin chemotherapy as a better alternative therapy for patient's survival.

Results and conclusions

To evaluate the effect of palbociclib *in vitro*, several urothelial carcinoma cell lines were assayed. As the main known target in CDK4/6 signaling is pRB, we included cell lines with and without *RB1* mutation (*RB1* mut and *RB1* wt, respectively). All evaluated cell lines showed sensibility to CDK4/6 inhibition by palbociclib regardless their *RB1* gene status. Nonetheless, when analyzing the cell cycle effect of this inhibitor, a different behavior was observed between cells with *RB1* wt or *RB1* mut. In particular, the cell cycle of *RB1* wt cells was blocked in the G1 phase. In contrast, *RB1* mut cells were blocked in the G2/M phase. These differences were corroborated with protein analysis. *In vivo* experiments, using xenograft models established by inoculation of cell lines in immunodeficient mice, also demonstrated the efficacy of palbociclib treatment independent of the *RB1* status of the generated tumor. Treated tumors showed diminished proliferation as well as mitosis and induction of apoptosis. Subsequent transcriptomic studies revealed FOXM1 transcription factor as a key regulator in the transcriptomic changes observed after palbociclib treatment. These results were further confirmed by biochemical analysis of the tumors obtained from the xenograft models, showing a decrease in the phosphorylated form of FOXM1 after treatment with palbociclib. Additionally, CDK4 silencing by using shRNA in two cell lines led to a decrease in the phosphorylated form of FOXM1 while overexpression of FOXM1 increased the

sensitivity of those cell lines to palbociclib, emphasizing that FOXM1 represents an indirect target of CDK4/6 inhibition by palbociclib treatment.

We also demonstrated that high levels of FOXM1 expression is associated with malignancy, recurrence and a higher grade as well as histological stage of the tumor in NMIUC. Consequently, we propose that FOXM1 could be a predictive biomarker for therapeutic response to palbociclib treatment.

In clinical practice, standard treatment for MIUC patients consists of chemotherapy containing a high dose of cisplatin. However, because of comorbidities due to the patients' age, many are not eligible for this therapy. Besides, it has previously been described that FOXM1 confers resistance to cisplatin, raising our interest in studying the effect of combined treatment with palbociclib and cisplatin. *In vitro* experiments showed a clear synergistic interaction, achieving a significant decrease in the IC50 corresponding to cisplatin in all cell lines evaluated for treatment with palbociclib. *In vivo* experiments using xenograft models demonstrated that the combined treatment produced a significant reduction in tumor growth, with a reduction in phosphorylated FOXM1 protein, decreased proliferation and induction of apoptosis. In order to be able to confirm the efficacy of a combination of those therapies in a more physiological context and similar to patients with urothelial carcinoma, a transgenic MIUC mouse model was generated, established by the deletion of 3 tumor suppressor genes (*Rb1*, *Pten*, and *Trp53*) in the basal urothelial cells (Keratin 5 positives) from animals deficient in *Rbl1*. Combined treatment with palbociclib and cisplatin using this mouse model showed again efficacy independent of the *RB1* status, which was validated by an increase in apoptosis markers and a decrease in markers related to tumor proliferation. A decrease in phosphorylated FOXM1 as well as the expression of multiple genes dependent on this transcription factor upon the treatment was found, confirming all the previous observations.

Summary

Taken together, these results offer a rational basis for possible clinical studies including urothelial carcinoma patients treated with palbociclib, either alone or in combination with cisplatin. We also propose the determination of FOXM1 expression as a possible predictor biomarker of response to these treatments.

Resumen

evolución/progresión y disponer de biomarcadores predictores de respuesta a una gran batería de tratamientos personalizados.

Objetivo

El objetivo principal de este proyecto es presentar datos científicos que apoyen las bases para un nuevo enfoque terapéutico en el cáncer urotelial. La hipótesis de trabajo es que el uso del inhibidor de CDK4/6, palbociclib, en combinación con el quimioterápico cisplatino utilizado actualmente, puede ser una mejor alternativa terapéutica para la supervivencia del paciente.

Resultados y conclusiones

Para evaluar el efecto de palbociclib *in vitro*, se analizaron varias líneas celulares de carcinoma urotelial. Debido a que sabemos que la diana principal en la señalización de CDK4/6 es pRB, se emplearon para dicho estudio líneas celulares con y sin mutación en *RB1* (*RB1* mut y *RB1* wt, respectivamente). Todas las líneas celulares evaluadas mostraron sensibilidad a la inhibición de CDK4/6 por el inhibidor palbociclib, independientemente del estado mutacional de *RB1*. Sin embargo, al realizar análisis de ciclo celular entre las células *RB1* wt y *RB1* mut encontramos comportamientos diferentes. En los genotipos *RB1* wt, la parada de ciclo celular tuvo lugar en la fase G1. Sin embargo, las células *RB1* mut el tratamiento con palbociclib la parada se produjo en la fase G2/M. En experimentos *in vivo*, realizando xenoinjertos mediante la inoculación de líneas celulares en ratones inmunodeficientes, también se demostró la efectividad del tratamiento con palbociclib independientemente del estado de *RB1* del tumor. Los tumores tratados presentaron disminución de proliferación, reducción de mitosis e inducción de apoptosis. Los análisis de estudios transcriptómicos realizados en células tratadas con palbociclib revelaron a FOXM1 como el regulador clave de los cambios observados por el tratamiento. Estos resultados fueron además confirmados posteriormente

mediante análisis bioquímicos de los xenoinjertos, donde observamos una disminución de la forma fosforilada de FOXM1 producida por el tratamiento con palbociclib. Adicionalmente comprobamos que el silenciamiento de CDK4 empleando shARN en dos líneas celulares provocaba una disminución de la forma fosforilada de FOXM1 y de manera concordante al aumentar la expresión de FOXM1 obtuvimos un aumento de sensibilidad al palbociclib en ambas líneas, corroborando por lo tanto que FOXM1 es una diana indirecta de la inhibición de CDK4/6 por tratamiento con palbociclib.

Al evaluar la expresión de FOXM1 en una serie de muestras de pacientes con CUNMI encontramos que, el aumento de expresión de FOXM1 está asociado con malignidad, recurrencia y mayor grado y estadio histológico de los tumores. Con estos resultados podemos sugerir que FOXM1 podría ser empleado como un biomarcador predictivo para la respuesta terapéutica al tratamiento con palbociclib.

El tratamiento estándar para pacientes con CUMI, consiste en quimioterapia con altas dosis de cisplatino. Sin embargo, debido a las comorbilidades de los pacientes, muchos no son elegibles para esta terapia. Además, anteriormente se ha descrito que FOXM1 confiere resistencia al cisplatino, lo que justifica nuestro interés en estudiar el efecto del tratamiento combinado con palbociclib y cisplatino. Los resultados de experimentos *in vitro* mostraron una fuerte interacción sinérgica, permitiendo disminuir considerablemente las dosis correspondientes de cisplatino en todas las líneas celulares evaluadas, por el tratamiento con palbociclib. En los ensayos *in vivo* mediante xenoinjertos se demostró que el tratamiento combinado produjo una reducción significativa del crecimiento tumoral, con una reducción de la proteína FOXM1 fosforilada, un menor nivel de proliferación y una inducción de apoptosis. Para poder comprobar la eficacia de la combinación de ambos compuestos en un contexto más fisiológico y parecido a los pacientes con CU utilizamos un modelo de ratón transgénico de CUMI generado mediante la delección de 3 genes supresores tumorales (*Rb1*, *Pten*, y *Trp53*) en las células uroteliales basales (Queratina 5 positivas) de animales deficientes en *Rbl1*. El tratamiento combinado de palbociclib

Resumen

y cisplatino en el modelo animal demostró nuevamente su efectividad independiente del estado de *RBI*, validado por un aumento de marcadores de apoptosis y por la disminución de marcadores relacionados con la proliferación tumoral. Estos resultados fueron a su vez reforzados al encontrar que los tumores de ratón tratados mostraron una reversión de los patrones de expresión génica de las células tumorales, incluida una disminución de FOXM1 fosforilada y de la expresión de múltiples genes dependientes de este factor de transcripción, corroborando los datos obtenidos anteriormente.

En conjunto, estos resultados ofrecen una base racional para posibles ensayos clínicos en pacientes de CU empleando palbociclib, sólo o en combinación con cisplatino, y proponiendo la determinación de los niveles de FOXM1 como posible biomarcador predictivo de respuesta a dichos tratamientos.

INTRODUCCIÓN



Introducción

El cáncer es un conjunto de patologías caracterizadas por el crecimiento descontrolado de células, que conlleva la formación de tumores o neoplasias y su posterior diseminación a distintos órganos, lo que provoca en muchos casos la muerte del paciente ¹. En España el cáncer es la segunda causa más frecuente de fallecimiento, y debido a que las estimaciones poblacionales indican que el número de nuevos casos aumentará en un 70% en las próximas dos décadas, hacen de esta enfermedad un problema social importante ²⁻⁴.

1. Cáncer de Vejiga.

El cáncer vesical/urotelial o de vejiga (CU o CV) representa el noveno tipo de cáncer más frecuente a nivel mundial y el segundo más frecuente del aparato genitourinario, con 500.000 nuevos casos diagnosticados en 2018 y más de 200.000 muertes anuales ⁵⁻⁷. Según la base de datos GLOBOCAN 2018, en España el cáncer urotelial representa el 12% de los tumores del sexo masculino y el 3 % de los femeninos. La incidencia de este cáncer en nuestro país es de las más altas del mundo, siendo el quinto tumor más frecuente. En 2017 en España fallecieron 5.000 personas por su causa con una edad media de fallecimiento por CU de 72 años entre los hombres y 75 entre las mujeres ⁸.

Aunque hoy en día no se ha encontrado ningún factor determinante para el desarrollo del cáncer de vejiga, diversos estudios lo han asociado a algunos de los factores de riesgo como el consumo de tabaco y la exposición a sustancias cancerígenas (del tipo aminas aromáticas encontradas en la industria del caucho, tintes u otros productos derivados del petróleo) ^{9,10}. Otro factor de riesgo es la edad; con una edad media en el momento del diagnóstico de 69 años para los hombres y 71 para las mujeres ^{9,10}. En cuanto al género, los hombres tienen de 2 a 3 veces más riesgo de desarrollar CU que las mujeres, aunque estas últimas tienden a presentar

Introducción

tumores más avanzados y de peor pronóstico. También se ha visto que las infecciones continuadas, ya sean cistitis, cálculos en el tracto urinario o infecciones por el parásito *Schistosoma* (propia del norte de África), y en general todas las infecciones crónicas del tracto urinario podrían contribuir a una inflamación crónica del epitelio urotelial y aumentar la probabilidad de desarrollar CU ^{6,9-14}.

1.1. Características Clínico-patológicas de tumores uroteliales.

Dentro de los distintos tipos de cáncer, el carcinoma urotelial es una neoplasia maligna que se origina a partir de las células epiteliales del urotelio. Este tejido conforma la capa epitelial (mucosa) de los órganos del tracto urinario inferior (los uréteres, la vejiga y la uretra), así como parte de la pelvis renal ^{15,16}. Histológicamente, más del 93% de los tumores de vejiga son carcinomas uroteliales originados en las células que recubren la pared interna de la vejiga (epitelio de transición). Además de los carcinomas de células de transición y los carcinomas de células escamosas (4%), en la vejiga se pueden formar adenocarcinomas (2%), carcinomas de células pequeñas (1%) y sarcomas (<1%) ¹⁷. Estos carcinomas de células transicionales (TCC) poseen características similares a los carcinomas uroteliales originados en otras áreas de las vías urinarias (pelvis renal, uréteres y uretra). Sin embargo, el carcinoma urotelial es una enfermedad muy heterogénea, ya que oscila desde tumores superficiales papilares bien diferenciados a tumores pobremente diferenciados e invasivos ¹⁷⁻¹⁹.

1.1.1. Tumores superficiales de vejiga.

La clasificación de los tumores uroteliales tiene particular importancia en los tipos de tumores no invasivos ya que son el tumor diagnosticado con mayor frecuencia en pacientes (75%). Según el sistema Tumor-Nodo-Metástasis (TNM) los carcinomas uroteliales no músculo invasivos (CUNMI) se pueden englobar en dos categorías según su crecimiento: papilar o plana (**Figura 1**). Los carcinomas planos crecen en la pared de la vejiga, sin invadir la luz de la vejiga ni los tejidos conectivos y musculares de la vejiga. A este tipo de tumor plano se le conoce como carcinoma plano no

invasivo (Tis) o carcinoma plano *in situ* (CIS). Los carcinomas papilares no invasivos son masas tumorales que crecen hacia la luz de la vejiga. Dependiendo de si existe invasión del tejido conectivo de la vejiga se subdividen en Ta, donde no hay invasión del tejido conectivo y T1, donde el tumor ha crecido hacia el tejido conectivo pero no ha alcanzado la capa muscular ^{19,20}.

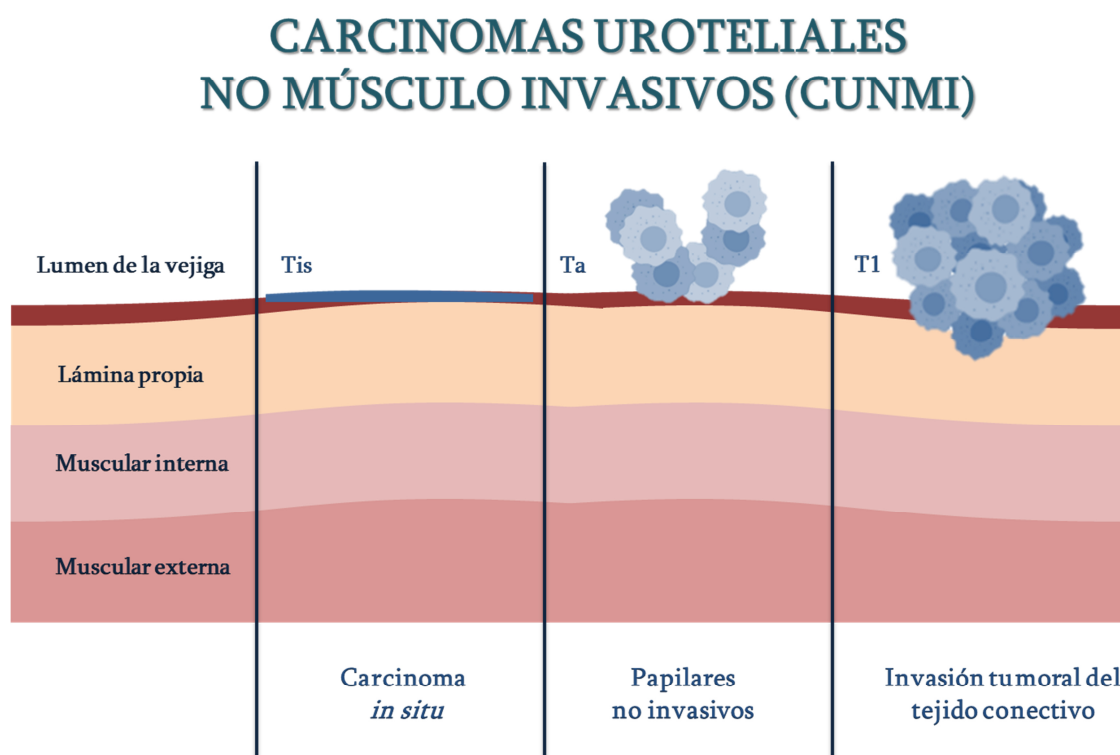


Figura 1. Estadificación del CUNMI. Se muestra la estadificación del cáncer de vejiga según el sistema TNM. Imagen modificada de ¹⁹.

Este tipo tumoral muestra una alta incidencia de recurrencia (75%), o reaparición de tumores vesicales, con un alto riesgo de progresión tumoral hacia tumores invasivos. Este riesgo de progresión se halla fuertemente asociado al grado histológico (grado de diferenciación celular) y al estadio clínico. La presencia de invasión vascular o linfática en un tumor T1 es un signo adverso, que se asocia frecuentemente con progresión a un tumor infiltrante en un período de tiempo de uno o dos años ²¹. Los tumores Tis/CIS, frecuentemente son más agresivos y el riesgo de progresión es mayor. Otros factores reconocidos como características de

Introducción

progresión a tumor invasivo son la multifocalidad tumoral, la recidiva de la enfermedad en los tres primeros meses de seguimiento, y en menor medida, el tamaño tumoral y la presencia de displasia en otras zonas de la vejiga ^{22,23}.

1.1.2. Tumores infiltrantes de vejiga.

Alrededor de un cuarto de los pacientes con CU tienen un tumor que invade la pared muscular de la vejiga (CUMI). Estos tienen una clasificación más extensa en el sistema TNM desde estadios T2 a T4 (**Figura 2**). La masa tumoral invade la capa muscular de la vejiga y así progresivamente hasta el estadio T4, en el que se produce la invasión de los órganos que rodean la vejiga, como la próstata (en varones), el útero y/o vagina (en mujeres) ^{19,20}.

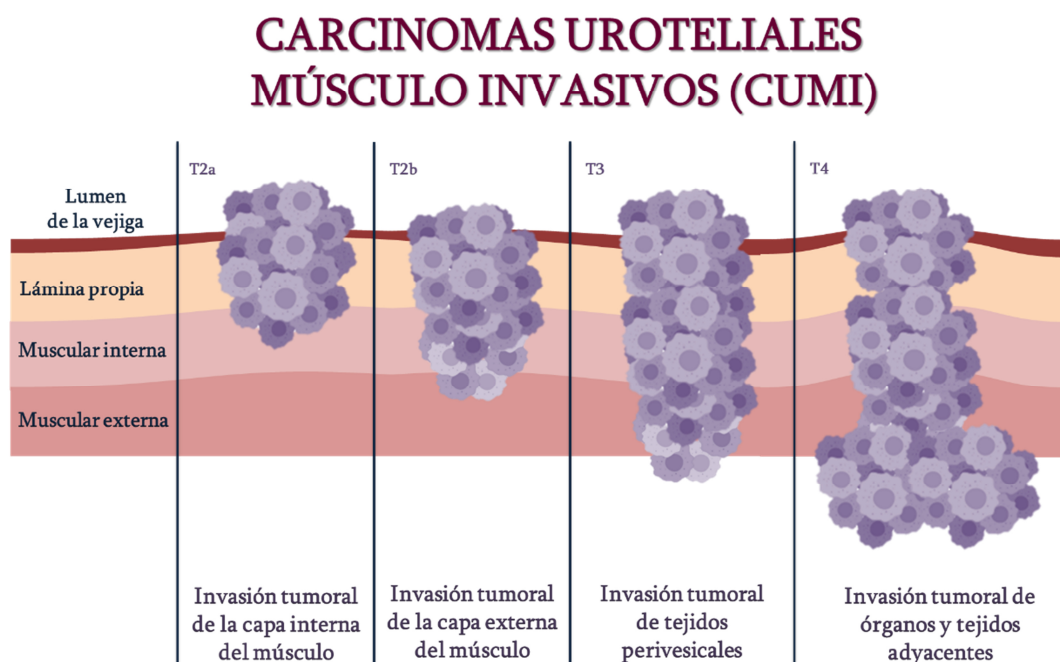


Figura 2. Estadificación del CUMI. Se muestra la estadificación del cáncer de vejiga según el sistema TNM. Imagen modificada de ¹⁹.

La supervivencia a 5 años a partir del diagnóstico para tumores con estadio T2 es cercana al 60%, frente a un 10-30% en los tumores con afectación de grasa perivesical (T3) u órganos vecinos (T4). Además, en más de la mitad de casos, los estadios avanzados T3-T4 se asocian a afectación ganglionar. La presencia de

metástasis proximales o distales se asocia a una supervivencia extremadamente baja (alrededor de un 5%). A diferencia de los CUNMI, el papel pronóstico del grado histológico es muy limitado en los pacientes con CUMI, pues prácticamente en casi todos los casos se trata de tumores de alto grado (pobrementemente diferenciados) ^{22,23}.

1.1.3. Otras clasificaciones de tumores de vejiga.

En 1973, la Organización Mundial de la Salud (OMS) creó la primera clasificación de tumores vesicales según el grado de diferenciación celular o histológica. En ésta los subtipos tumorales se dividen en cuatro grandes grupos: Papiloma urotelial, Grado 1 (bien diferenciado), Grado 2 (moderadamente diferenciado) y el Grado 3 (pobrementemente diferenciado/indiferenciado). Más adelante, en 1998, la OMS y la Sociedad Internacional de Patología Urológica (ISUP, del inglés *International Society of Urological Pathology*) propusieron una nueva clasificación de CUNMI, que fue publicada por la OMS en 2004 y que ha sido actualizada en 2016 ¹⁷. Esta clasificación subdivide los CUNMI en neoplasias uroteliales papilares de bajo potencial maligno (PUNLMP, del inglés *papillary urothelial neoplasm of low malignant potential*), carcinomas uroteliales papilares no invasivos de bajo grado (NILGC, del inglés *noninvasive papillary urothelial carcinoma low-grade*) y en carcinomas uroteliales papilares no invasivos de alto grado (NIHGC, del inglés *noninvasive papillary urothelial carcinoma high-grade*) (**Figura 3**). Estas clasificaciones buscan distinguir claramente entre tumores de bajo grado y de alto grado a través de criterios histológicos precisos para obtener grupos con comportamientos clínicos distintos ²⁴.

1.2. Tratamientos del cáncer de vejiga.

Frecuentemente, el primer signo clínico del CU es la presencia de sangre en la orina (hematuria), el cual puede ir seguido de otros síntomas como el aumento en la necesidad de orinar, o un flujo débil de orina. A medida que progresa el cáncer a estadios más avanzados, los síntomas pueden evolucionar a dolores en la región lumbar, dolor óseo, cansancio, malestar y disminución de la capacidad de orinar.

Introducción

Todos estos síntomas son característicos del CU, pero pueden estar asociados con otras patologías del tracto urinario. Por esta razón el diagnóstico principal se realiza mediante cistoscopia, una técnica invasiva mediante la cual un personal especializado evalúa de manera ocular la vejiga del paciente mediante un abordaje transuretral ^{6,19,25,26}.

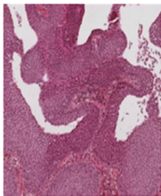
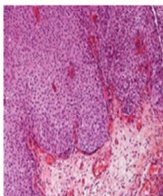
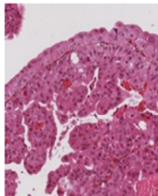
POTENCIAL BIOLÓGICO	Neoplasia papilar con bajo potencial maligno	Bajo	Alto
Descripción 2004/16	Papilas delgadas sin atipia, sin engrosamiento del urotelio	Las papilas tienen capas aumentadas, la atipia es rara, se conserva la polaridad	Mayor atipia, la arquitectura destruida.
Micrografía			

Figura 3. Clasificación del CUNMI. Se muestran las características histológicas de acuerdo a la clasificación del cáncer de urotelial según la OMS de 2016. Imagen modificada de ²⁴.

Las opciones terapéuticas en la práctica clínica están determinadas de acuerdo al estadio histológico del diagnóstico. Para los CUNMI el principal tratamiento es la resección transuretral (RTU), la cual consiste en la escisión de la masa tumoral de la vejiga a través del conducto uretral mediante un resectoscopio ²⁷. Este tratamiento puede ser continuado con vigilancia médica (seguimiento minucioso sin más tratamiento) o con terapia por instilación intravesical con el *Bacillus Calmette Guerin* (BCG) o mitomicina C, dependiendo de las características histológicas del tumor y los riesgos de recurrencia o progresión de la enfermedad a estadios más avanzados. Aunque aún no está del todo claro el mecanismo mediante el cual la instilación con BCG disminuye el riesgo de recurrencia, se ha demostrado que en aquellos pacientes que responden de manera satisfactoria, este tratamiento provoca una infección local seguida de un proceso inflamatorio que contribuye a la

erradicación del tumor y previene su recurrencia ^{28,29}. La mitomicina C es un agente antitumoral que se une al ADN provocando alquilaciones que impiden la duplicación del material genético, causando eventualmente la muerte celular. Debido a que las células cancerosas, en general, se dividen más rápido y con menor corrección de errores que las células sanas, son más sensibles a este daño ³⁰. Muchos pacientes diagnosticados con tumores tipificados para estos tratamientos no son aptos para recibir estas terapias debido a comorbilidades frecuentes en individuos de avanzada edad. En ellos el empleo de estas terapias puede generar importantes efectos secundarios que con frecuencia limitan el esquema de tratamiento completo.

A pesar de que los CUNMI muestran un mejor pronóstico, muestran una alta tasa de recurrencia (50-70%), y en muchos de los casos (15%) se observa una progresión a CUMI ^{12,25,31,32}. Por ello, los pacientes requieren un seguimiento continuo por cistoscopia (cada 3-6 meses), citología y continuas RTU's en su caso, provocando que el CUNMI sea de las neoplasias con mayor afectación en calidad de vida de los pacientes oncológicos con tumores no invasivos y más costosa para los sistemas nacionales de salud de los países desarrollados ³³. En consecuencia, el CU representa el cáncer humano más caro desde el diagnóstico hasta la muerte, con un coste estimado de 187.000 dólares por paciente en los Estados Unidos ³¹. En 2010, su coste anual total se estimó en 4 mil millones de dólares, que con una predicción de progresión a aproximadamente 5 mil millones en 2020 ^{31,34}. En la Unión Europea, en 2012, el gasto total de CU se determinó en 4,9 mil millones de euros y el coste de la asistencia médica en 2,9 mil millones ³⁵, lo cual representa un importante gasto del capital total en este concepto.

Para el tratamiento de los pacientes con CUMI, suele ser necesario llevar a cabo la extirpación parcial o total de la vejiga dependiendo de si el tumor se encuentra muy localizado o de si el tumor es de mayor tamaño o está diseminado por distintas partes de la vejiga, respectivamente. A causa del alto porcentaje de pacientes que presentan diseminación tumoral, frecuentemente se administra quimioterapia antes (neo-adyuvancia) y después de la cirugía (adyuvancia) para contribuir a la total

Introducción

erradicación y disminuir la probabilidad de que el cáncer reaparezca. Las quimioterapias administradas suelen basarse en gemcitabina sola o combinada con derivados del platino, como el cisplatino o el carboplatino, y seguidas o no de radioterapia (**Figura 4**). No obstante, al igual que en el caso de los CUNMI, la avanzada edad de los pacientes, asociada a otras comorbilidades como la obesidad, la disfunción renal, la diabetes o enfermedades cardíacas, hace que una alta proporción de pacientes sean “no aptos” para el tratamiento con quimioterápicos o para la realización de cistectomía. Estos pacientes, a menudo no son considerados idóneos para las distintas líneas de tratamientos a seguir (pacientes “unfit”) y, por lo tanto, tienen pocas opciones terapéuticas ³⁶. A pesar de todos estos tratamientos, en una alta proporción de los casos, la enfermedad progresa alcanzando diseminación metastásica, lo que conlleva una tasa muy baja de supervivencia (cerca al 5% a los cinco años) ^{20,37-39}.

Muchas líneas de investigación en CU se centran en encontrar dianas terapéuticas moleculares como opción de tratamiento no quirúrgico, que permitan mejorar la supervivencia del paciente y la prevención de aparición de nuevos tumores. A pesar de esto, en los últimos 30 años no ha habido un gran cambio en el tratamiento de esta patología. Sólo en los últimos 5 años se ha introducido la inmunoterapia basada en inhibidores de punto de control inmune, centrados en el bloqueo de la vía de señalización por PD-1 o de su ligando PD-L1 ¹³. Estos han representado una auténtica revolución del tratamiento del cáncer, con respuestas positivas mantenidas sin efectos secundarios notables. No obstante, el porcentaje de pacientes que se benefician de estos tratamientos sigue siendo limitado (20-30%) ^{6,12}. Por tanto hay una clara necesidad de mejoras terapéuticas, búsqueda de nuevas herramientas predictivas y pronósticas, así como la implementación de nuevas terapias molecularmente dirigidas al CU ^{7,25,40,41}.

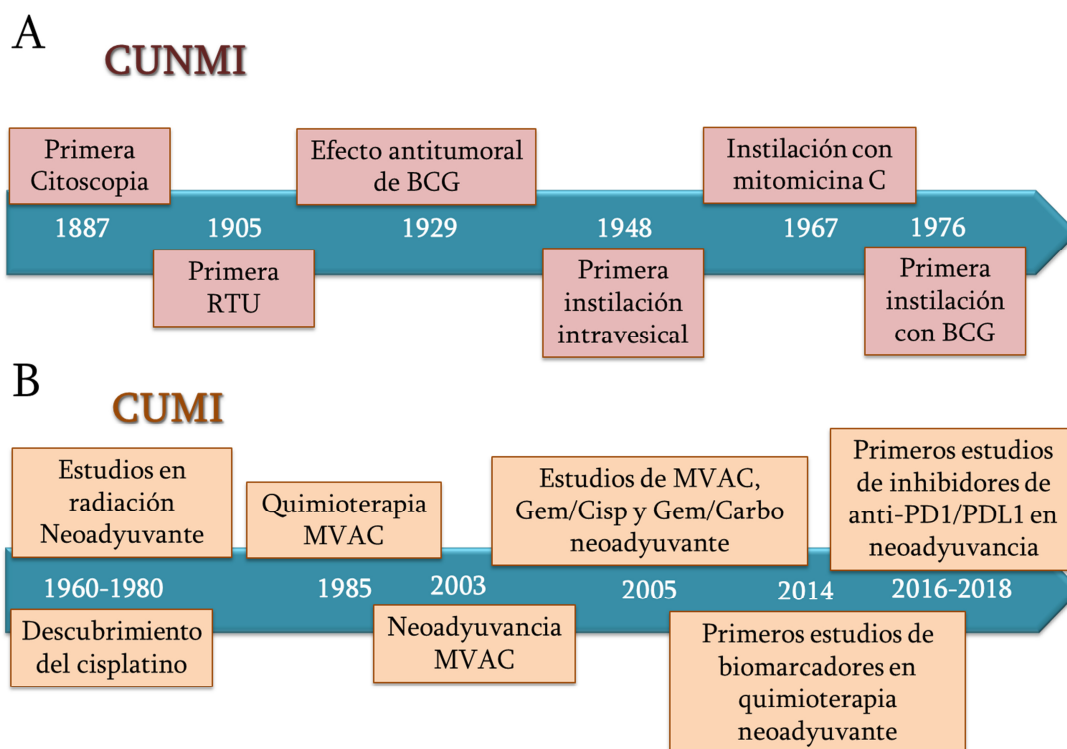


Figura 4. Líneas temporales de evolución de los tipos de tratamiento en cáncer de vejiga. A. Carcinoma urotelial no invasivo (CUNMI). **B.** Carcinoma urotelial invasivo (CUMI). MVAC: methotrexate vinblastina adriamicina (doxorubicina) cisplatino, Gem/Cisp: gemcitabina/cisplatino, Gem/Carbo: gemcitabina/carboplatino, BCG: bacillus Calmette-Guerin. Imagen modificada de ^{42,43}.

2. Ciclo celular: control y regulación

El ciclo celular en mamíferos es un proceso altamente organizado y regulado que garantiza la división celular. Consiste en cuatro fases altamente reguladas denominadas y ordenadas temporalmente G1 (gap 1), S (síntesis de ADN), G2 (gap 2) y M (mitosis/meiosis). Estas fases están definidas en dos períodos funcionales ordenados cronológicamente: interfase (que comprende el período de las fases G1–S y G2) y división celular, fase M (**Figura 5**) ⁴⁴. Los procesos celulares que ocurren en cada una de las fases son:

✚ **Fase G1.** En esta fase la célula desarrolla una intensa actividad metabólica, aumentando de tamaño y generando nuevos orgánulos (ribosomas, mitocondrias y estructuras membranosas). Igualmente, la producción de ácidos nucleicos y de las enzimas necesarias para la replicación se ve aumentada. En esta fase también

Introducción

se inicia la replicación de los centriolos, que no se completará hasta el comienzo de la mitosis, y aumenta el número de microtúbulos. Este período transcurre entre el fin de una mitosis y el inicio de la síntesis de ADN ⁴⁵.

✚ **Fase S.** Este período comprende la síntesis de nuevo material genético por la ADN-polimerasa. En esta fase se sintetizan las proteínas histonas y enzimas asociadas con la replicación del ADN. Al final de la etapa el material genético queda duplicado y formado por dos cromátidas idénticas. Cuando el ADN se ha replicado completamente, la célula continúa su preparación para la mitosis entrando en la fase G2 ⁴⁶.

✚ **Fase G2.** Es la tercera fase de crecimiento del ciclo celular en la que se continúa la síntesis de proteínas y factores esenciales para la mitosis. La fase G2 termina cuando comienza la profase del período M, cuando los cromosomas comienzan a condensarse. Esta fase proporciona un lapso de seguridad, que permite a la célula confirmar que se ha completado con éxito la replicación del ADN, antes de iniciar la mitosis ⁴⁷.

✚ **Fase M.** Está a su vez dividida en: profase, metafase, anafase, telofase; y la citocinesis (separación física del citoplasma en dos células hijas), que se inicia ya en la telofase mitótica. En esta fase se lleva a cabo la descomposición de la envoltura nuclear, segregación de los cromosomas por el huso mitótico y la separación física de las células hijas ^{46,48}.

La entrada en un nuevo ciclo de división celular está determinada por mitógenos (factores que actúan en el ciclo celular estimulando la división celular) y por la propia información interna de la célula. Algunas señales externas afectan a la progresión del ciclo hasta determinados momentos, llamados *check-points* o puntos de control. Uno de ellos es el conocido como **punto de restricción R**, en la Fase G1. Antes de superar este punto las células pueden abandonar el ciclo, temporal o permanentemente, y entrar en una fase de arresto o fase quiescente, llamada **Fase G0**

^{44,49-51}.

La regulación del ciclo celular es fundamental para el desarrollo normal de los organismos; la pérdida de control podría llevar a la muerte celular o a un proceso de crecimiento descontrolado (ej. cáncer) ⁵².

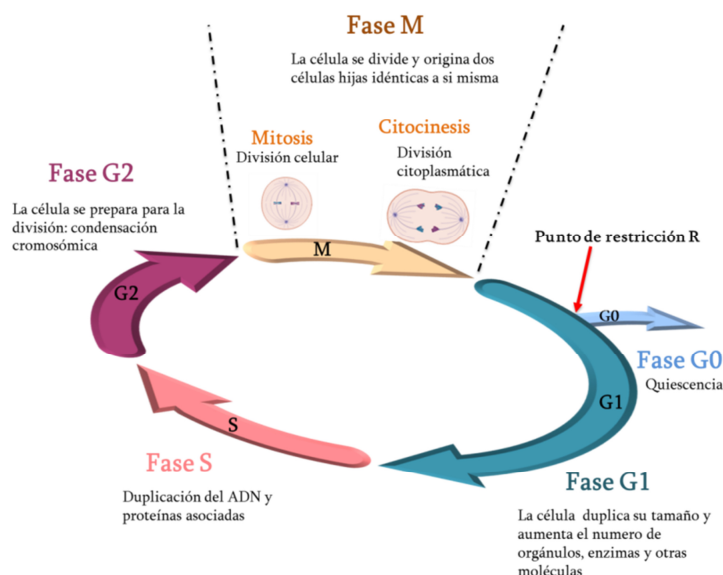


Figura 5. Esquema ciclo celular y ciclo de división celular. Imagen modificada de ⁵³.

2.1. Regulación del ciclo celular.

2.1.1. Puntos de control del ciclo celular.

Los puntos de control celular son mecanismos que verifican si los procesos en cada fase del ciclo celular han sido completados con precisión antes de progresar hacia la siguiente fase. Hay dos puntos de control principales, uno en la transición G1/S y otro en G2/M. El punto de control G1/S comprueba la existencia de daños en el ADN. Si hay daño en el ADN, se detiene el ciclo celular y se activa la maquinaria de reparación del ADN. La ralentización en la progresión del ciclo celular proporciona el tiempo para la reparación del ADN. Si el daño no es reparable, se activan las vías apoptóticas que provocan la muerte celular. Así, el punto de control G1/S impide la replicación de células que tienen defectos en el ADN y que serían perpetuados, como mutaciones o rupturas cromosómicas, en la progenie celular. El punto de control G2/M analiza la terminación de la replicación del ADN y comprueba si la célula puede iniciar la mitosis con seguridad ^{47,48}.

Introducción

2.1.2. Ciclinas, CDKs y CKIs.

Los factores que modulan la salida de G0 y la progresión a las diferentes fases del ciclo son cruciales para determinar la frecuencia del crecimiento y son orquestadas por complejos de proteínas enzimáticamente activos. Estos complejos están compuestos de una subunidad catalítica, conocida como quinasa dependiente de ciclina (CDK), y una subunidad reguladora, denominada ciclina. Estas CDKs son moléculas reguladoras cuya función es fosforilar residuos de serina y treonina de proteínas específicas⁵². Para que se lleve a cabo la activación de CDK, ésta tiene que asociarse a una ciclina. Las CDK's se pueden agrupar en dos tipos, uno, las CDK que se unen a múltiples ciclinas y pueden regular el ciclo celular (CDK1-6) y, un segundo formado por las CDK que se activan por una sola ciclina y están involucradas en la regulación de la transcripción (CDK7-9)⁵². Dependiendo de la fase del ciclo en la que aparecen las ciclinas y las CDKs a la que se asocian, se distinguen cuatro tipos de ciclinas⁵⁴ (**Figura 6**):

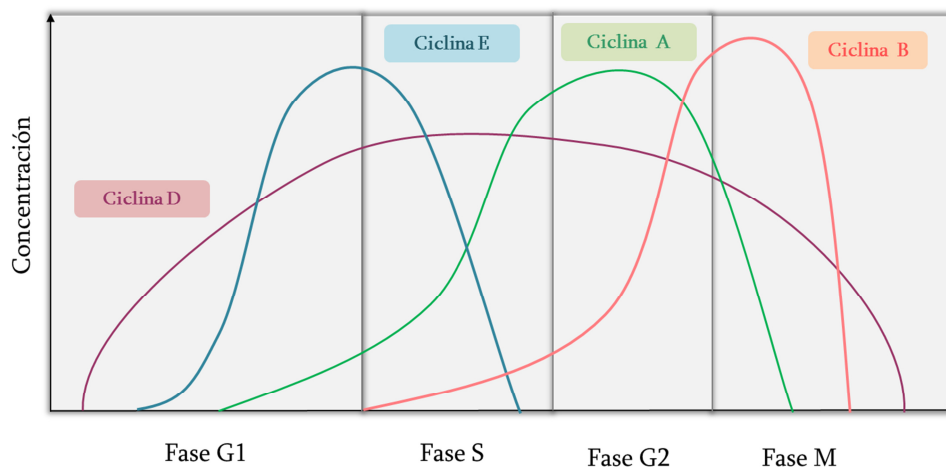


Figura 6. Ciclo de expresión de las ciclinas en las distintas fases del ciclo celular.

- Ciclinas de Fase G1: impulsan el paso por el punto de restricción R, lo que conlleva la entrada de la célula en un nuevo ciclo celular. Son las ciclinas D1-D3, que se asocian a CDK4 y CDK6 durante G1.

- Ciclinas interfase G1-S: es la ciclina E asociada a CDK2, que es demandada para el inicio de la replicación del ADN.
- Ciclinas de fase S: son la ciclina A, que se asocia a CDK2 y CDK1.
- Ciclinas de fase mitóticas: son la ciclina A y, sobre todo, las ciclinas B que se asocian a CDK1.

Los complejos CDK-ciclina están regulados por procesos de fosforilación y desfosforilación, ubiquitinación y degradación proteolítica de ciclinas. Existen moléculas inhibidoras de CDK, llamadas CKI (del inglés, *cyclin dependent kinase inhibitors*). Estas proteínas se unen a CDKs o a los complejos CDK-ciclina y bloquean su actividad ^{46,50,53,55}. Estas CKIs se subdividen en dos familias dependiendo de su diana (Figura 7):

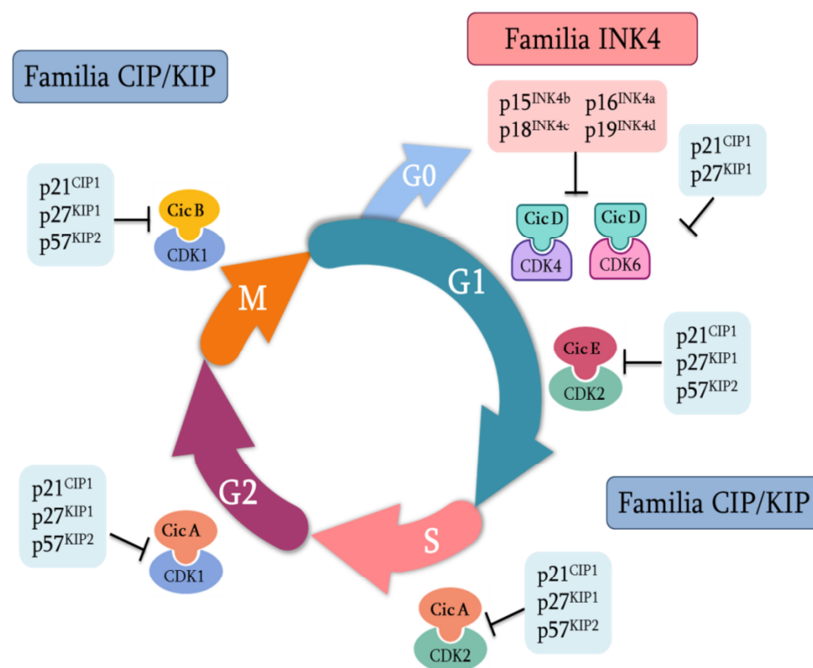


Figura 7. Esquema del ciclo celular con los complejos CDK-ciclina y sus inhibidores.

-CIP/KIP (del inglés, *kinase inhibitor protein*): en ella se incluyen a p21^{Cip1}, p27^{Kip1} y p57^{Kip2}. Interactúan inhibiendo la actividad de los complejos CDK2-ciclina E, CDK2-ciclina A, CDK1-ciclina A, CDK1-ciclina B, CDK5/6-ciclina D ^{50,52,55,56}.

Introducción

-Familia INK4 (del inglés, *inhibitor of CDK4*) inhiben específicamente a CDK4 y CDK6 en la primera fase del ciclo. Está compuesta por p15^{INK4b}, p16^{INK4a}, p18^{INK4c} y p19^{INK4d} ^{50,52,55,56}.

3. CDK4-6 ciclo celular y regulación

El primer punto de compromiso del ciclo celular ocurre en la fase G1, cuando las ciclinas D1, D2 y D3 son expresadas en respuesta a señales mitogénicas, y se unen a CDK4 y CDK6 ^{55,57,58}. Ambas proteínas pertenecen al grupo de Ser/Thr quinasas. Aunque CDK6 ha sido menos estudiado que CDK4, en general se ha supuesto que las dos quinasas desempeñan funciones idénticas o muy similares en las células ⁵⁸.

El complejo CDK4/6-ciclina D contribuye a una inactivación parcial de la proteína del retinoblastoma (pRB) y sus proteínas relacionadas, p107 (*RBL1*) y p130 (*RBL2*). En células quiescentes pRB se encuentra hipofosforilado y unido a factores de transcripción de la familia E2F, compuestos por dímeros de una proteína E2F y una proteína DP. Estos factores activan la transcripción de genes necesarios para la entrada en la Fase S, pero no son funcionalmente activos cuando se encuentran unidos a pRB. Además de esto, la asociación pRB-E2F forma un complejo represor transcripcional mediante el reclutamiento de histona deacetilasas (HDAC) y otros factores de la remodelación de la cromatina ⁵⁹. Cuando se produce la fosforilación de pRB por los complejos CDK4/6-ciclina D durante la Fase G1 en la región C-terminal de la proteína se produce un cambio conformacional permitiendo la expresión de ciclinas E. Estas ciclinas E se unen y activan CDK2, y vuelven a fosforilar a pRB, lo que conduce a su completa inactivación y la liberación de los factores E2F provocando la continuidad del ciclo (**Figura 8**) ^{55,57}.

3.1. Regulación de la actividad de CDK4.

Como se mencionó anteriormente, los miembros de la familia de proteínas INK4 (p16^{INK4a}, p15^{INK4b}, p18^{INK4c}, p19^{INK4d}) son los principales reguladores de la actividad de CDK4/6. Esta familia inhibe la actividad de CDK4/6 interactuando específicamente

con estas quinasas, evitando así su asociación con las ciclinas D. En células proliferativas, las proteínas INK4 están presentes en niveles muy bajos, mientras que su expresión aumenta rápidamente cuando se producen señales de estrés celular o de inhibición del crecimiento, como la senescencia ⁶⁰.

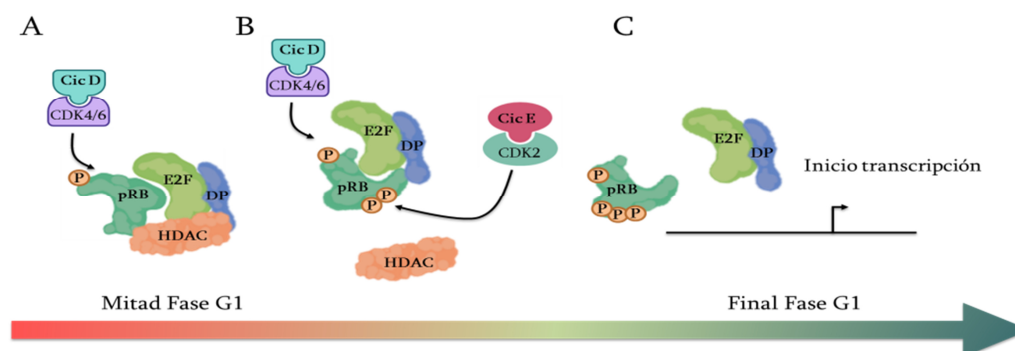


Figura 8. Esquema del punto de control R en el ciclo celular. A. Fosforilación de CDK4/6 en pRB. B. Cambio conformacional de pRB y desprendimiento de HDAC, fosforilación de ciclina E y CDK2 en pRB. C. pRb está hiperfosforilado y se produce la liberación de los factores E2F.

El miembro de la familia CIP/KIP $p27^{CIP1}$ se expresa a lo largo de la mayor parte del ciclo celular. En células proliferativas su expresión está asociada a complejos de CDK4/6-ciclina D. Sin embargo, investigaciones precedentes han revelado un doble papel de p27, que se comporta como un inhibidor y un activador de CDK4/6-ciclina D y CDK2-ciclina E, en función de la fosforilación de una tirosina específica, y del estado de crecimiento de la célula ⁶¹. En las células con el ciclo celular activo, el complejo CDK4/6-ciclina D secuestra a p27 lejos de CDK2, asegurando de esta forma que CDK4 y CDK2 se mantengan activas, y favoreciendo la progresión de la fase S. Sin embargo, cuando se añade un agente antiproliferativo como el $TGF\beta$, se produce la liberación del $p15^{INK4b}$. La unión de $p15^{INK4b}$ al complejo CDK4/6-ciclina D conduce a la liberación de p27 del complejo, y a la inhibición del ciclo celular por la unión de p27 al complejo CDK2-ciclina E ⁶². Otra teoría que se ha postulado es que p27 se fosforila (forma activa) preferentemente en células en proliferación con altos niveles

Introducción

de actividad de tirosina quinasa. Si p27 no está fosforilada debido a la falta de actividad tirosina quinasa, inhibe la actividad de CDK4/6 ⁶³.

La proteína supresora de tumores p53 media el punto de control inducido por daños en el ADN a través de la transactivación de varios genes inhibidores del crecimiento o apoptóticos. Entre estos genes, la proteína p21^{Cip1} media la detención del ciclo celular en fase G1 mediante la señalización de p53 ⁶³, inhibiendo los complejos CDK4/6-ciclina D y CDK2-ciclina E ⁶⁴.

4. RB, FOXM1, dianas de CDK4-ciclina D

4.1. Proteína del Retinoblastoma (RB)

La familia de las proteínas *pocket* (del inglés, bolsillo), está formada por tres miembros pRB, p107 y p130. La característica principal de esta familia es que presentan un dominio “pocket” para la unión funcional a otras proteínas, los factores de transcripción E2F. Las proteínas p107 y p130, son estructural y funcionalmente similares a pRB y participan en las mismas vías de señalización. Ambas se unen preferentemente a factores E2F (E2F4 y 5) diferentes de aquellos que se unen a pRB (E2F1-E2F3), y son necesarios para la regulación de genes sensibles a E2F. Por otra parte, mientras pRB se expresa en todas las células independientemente de si proliferan o no, la expresión de p107 es característica en células proliferativas y la de p130 en células que sufren parada del ciclo celular ^{65,66}.

Como se mencionó anteriormente, pRB es el sustrato mejor caracterizado del complejo CDK4-ciclina D1 ⁵⁷. Sin embargo, investigaciones recientes sugieren que la vía de pRB no media todas las funciones catalíticas de CDK4/6. Anders et al (2011) realizaron un trabajo de investigación centrado en la búsqueda de los sustratos de CDK4/6 a través de una minuciosa investigación del proteoma humano. En el estudio identificaron 68 posibles sustratos y revelaron que muchos de ellos contienen una función reguladora de transcripción. Entre estos sustratos se encuentra FOXM1 (del

inglés, *Forkhead box protein M1*, Proteína M1 de la caja de Forkhead) que puede activarse por CDK4/6 de forma independiente de pRB⁶⁷.

4.2. FOXM1

FOXM1 es un miembro de la familia de factores de transcripción Forkhead. Esta familia se caracteriza principalmente por tener un dominio de unión a ADN común, denominado *Forkhead Box*. Este dominio está implicado en un amplio espectro de procesos biológicos, incluidos el metabolismo, el desarrollo, la diferenciación, la proliferación, la apoptosis, la migración, la invasión y la longevidad ⁶⁸. El gen FOXM1 humano consta de 10 exones, dos de los cuales se expresan alternativamente produciendo tres isoformas FOXM1A, FOXM1B y FOXM1C. De ellas, sólo FOXM1B y FOXM1C son transcripcionalmente activas ⁶⁹.

Los factores de transcripción FOXM1 son cruciales para la progresión de fase del ciclo celular G1-S y G2-M y la integridad del huso mitótico⁶⁹. En células de mamíferos, FOXM1 regula la proliferación celular esencialmente a través del control de p21^{Cip1} y p27^{Cip1}, y activando los activadores de CDK o las ciclinas, como CDK2-ciclina A. FOXM1 promueve la expresión de genes como *CKS1* y *SKP2*, que son esenciales para la proteólisis de p27^{Cip1} y la transición de las células de la fase G1 a la fase S. Además, se ha demostrado que FOXM1 estimula la expresión de genes de la fase G2, como *CCNA*, *CCNB1*, *CDC25B* y *CENPF*, que son reguladores esenciales de la mitosis ^{69,70}. Wierstra *et al*, sugiere que la activación de FOXM1C ocurre cuando la activación de señales, como CDK4/6-ciclina D1 y CDKs-ciclina A, liberan el dominio de trans-activación (TAD), de la inhibición al que está sometido por la interacción de sus dominios inhibidores ^{69,70}.

5. RB, CDK4/6 y FOXM1 en cáncer

5.1. Proteína del Retinoblastoma (RB).

Los datos de tumores humanos y los estudios en modelos de ratones indican que *RBI* está mutado en la mayoría de los retinoblastomas, osteosarcomas y cánceres de pulmón de células pequeñas, y está mutado a frecuencias más bajas en una gran variedad de otros tipos de cáncer ⁷¹. La proteína pRB a menudo se describe como un componente de una vía reguladora que se inactiva en la mayoría de los cánceres (la vía INK4A/ ciclinaD1/pRB/E2F) ⁵¹. El gran volumen de literatura sobre proteínas asociadas a pRB pone en evidencia que es una proteína muy versátil involucrada en muchos procesos celulares ⁷². El desarrollo de inhibidores efectivos para CDK4/6 ha sido una de las aplicaciones más impactantes de la investigación de pRB ⁵¹. Aquellos tumores que presentan una actividad normal de pRB probablemente dependen de la actividad de CDK4/6 para el control de la proliferación celular. En estos tumores el aumento de expresión o hiperactivación de los complejos de CDK4-ciclina D1, la pérdida de reguladores negativos de CDK4-ciclina D1 como p16^{INKa}, o por vías de señalización oncogénicas que estimulan la actividad de CDK4/6-ciclinaD1 pueden ser los responsables de la desregulación del ciclo celular ^{58,73}.

En el CU, las alteraciones del gen *RBI* se han relacionado en general con estadios avanzados y con una baja supervivencia¹⁶. También se ha demostrado el efecto colaborador de pRB y p53 en la progresión tumoral de los pacientes con CU, tanto en tumores superficiales, como en invasivos ⁷⁴.

5.2. CDK4/6

La proliferación celular excesiva inducida por la progresión aberrante del ciclo celular se considera una característica distintiva del cáncer ⁷⁵. La vía de señalización de CDK4/6-ciclinaD1-INK4-RB se cree que está desregulada en la mayoría de los tumores humanos ⁷⁶. CDK4/6 y ciclina-D1 son ampliamente reconocidos como oncogenes, ya que se encuentran entre los 10 *loci* genómicos que se encuentran más

frecuentemente amplificados en un diverso grupo de cánceres humanos ⁷⁷. La amplificación de los genes que codifican ciclina D1 (*CCND1*), CDK4 o CDK6, o la eliminación del locus que codifica p16^{INK4A} (*CDKN2A*) son los principales mecanismos por los cuales se puede producir una activación aberrante de la vía de señalización CiclinaD-CDK4/6-INK4A. Las mutaciones o translocaciones específicas en los genes que codifican los componentes de la ruta de la ciclina D-CDK4/6-INK4-Rb también pueden dar como resultado una activación de la ruta aberrante. Por ejemplo, la mutación de CDK4 en R24C evita la unión de p16^{INK4A}, dando como resultado una actividad quinasa no reprimible⁷³. Además, en diversos tipos tumorales, tales como en carcinomas mamarios, melanomas, linfomas, leucemias y gliomas se ha observado una amplificación génica o aumento de expresión de CDK4/6. En cáncer mamario y carcinomas de cabeza y cuello son frecuentes las amplificaciones en ciclina-D1 ^{78,79}.

Una característica común en el CU es la pérdida de regulación en el ciclo celular, incluyendo las alteraciones en la ruta CDK4/6-pRB. En el CUMI las deleciones en el cromosoma 9 se producen en más del 50% de los tumores, en este cromosoma se encuentran los supresores tumorales *CDKN2A* (p14 y p16). Según los estudios moleculares las mutaciones en *CDKN2A* y *RBI* son mutuamente excluyentes. Sin embargo, la mayoría de las mutaciones en *CDKN1A* (p21) estuvieron implicadas con la pérdida de función de esta proteína. Todo ello junto con una amplificación o aumento de expresión del 10-20% del gen *CCND1* (ciclina D1) remarca la importancia de la señalización de la vía de CDK4/6 en el desarrollo y transcurso del CU ^{80,81}.

5.3. FOXM1

La activación anormal de FOXM1 produce una alteración del equilibrio entre la proliferación celular, la diferenciación y la apoptosis, y se conoce como un sello distintivo en los cánceres humanos. La amplificación del locus FOXM1 se ha demostrado en una amplia variedad de cánceres, incluido el cáncer de vejiga ⁸²,

Introducción

cáncer de mama⁸³, carcinomas de células escamosas de cabeza y cuello⁸⁴, cáncer de páncreas⁸⁵, cáncer gástrico⁸⁶, cáncer de pulmón ⁸⁷y cánceres de cuello uterino⁸⁸. Además, mediante los perfiles de expresión génica de distintos cánceres, FOXM1 ha sido caracterizado como uno de los genes que más comúnmente tiene aumentado su expresión ⁸⁹.

No es de extrañar que la expresión de FOXM1 se encuentre aumentada frecuentemente en tumores humanos, ya que una de sus funciones biológicas es la supresión de la senescencia celular ⁷⁰. Muchos estudios enfatizan el vínculo entre la desregulación de FOXM1 y la progresión del cáncer, de hecho, se ha encontrado que el aumento de expresión de FOXM1 contribuye a la tumorigénesis y los procesos implicados en ésta, como la angiogénesis, invasión, metástasis y resistencia a fármacos quimioterapéuticos ^{90,91}. La participación de FOXM1 en los pasos iniciales de metástasis se ha descrito en numerosos estudios *in vitro* ⁹²⁻⁹⁴. En concordancia con esto, estudios recientes han demostrado que la regulación negativa de FOXM1 mediante la inhibición de factores como VEGF, MMP-2 y MMP-9, inhibe el crecimiento celular, la migración y la invasión en una variedad de tipos de tumores, incluidos cánceres de páncreas y cáncer de mama, ⁹⁵. En CU la expresión elevada de FOXM1 está asociada a un peor pronóstico, y puede usarse como un factor de predicción de supervivencia ⁹⁶. Por todo ello, FOXM1 se puede convertir en un objetivo terapéutico interesante. Desafortunadamente, los factores de transcripción que se encuentran fuera de la familia de receptores nucleares carecen de zonas de unión al sustrato y a menudo se caracterizan por tener superficies hidrófobas con pocas regiones bloqueables mediante fármacos. Esto hace que pocos compuestos hayan demostrado especificidad en la inhibición de la actividad de FOXM1 ⁹⁷.

6. Inhibidores de CDK4/6.

La pérdida del control del ciclo celular es un rasgo distintivo del cáncer ⁷⁵. Entre las distintas terapias existentes para frenar este descontrol celular encontramos los inhibidores de CDK4/6 que afectan al punto de control del ciclo celular G1-S

mediante el mantenimiento de la actividad pRB. La prueba de concepto de que la inhibición de CDK4 podría ralentizar el crecimiento tumoral fue demostrada a principios de la década de 1990 ⁷³. Más de 20 años después de esta observación, el empleo en la clínica de inhibidores específicos de CDK4/6 están mostrando una eficacia significativa en la terapia antitumoral. Esta clase de compuestos están bajo investigación y aplicación clínica en distintos tipos de tumores sólidos, y recientemente ha sido aprobado por la FDA para el tratamiento del cáncer de mama ⁷³. En el cáncer de mama HR⁺ (del inglés, *Hormone Receptor*), los estrógenos estimulan la producción de ciclina-D1, y esta característica es considerada como un marcador de mal pronóstico. En los estudios preclínicos llevados a cabo, se ha encontrado que la inhibición de CDK4/6 previene la interacción con la ciclina-D1 y la posterior fosforilación de pRB, lo que lleva a la detención del ciclo celular y la restricción de la proliferación celular. Actualmente hay cuatro inhibidores de CDK4/6 disponibles para su empleo en EE.UU: palbociclib (Ibrance, Pfizer), ribociclib (Kisqali, Novartis), abemaciclib (Verzenio, Lilly) y trilaciclib (G1T28, G1 Therapeutics) ⁹⁸.

Palbociclib fue el primer inhibidor de CDK4/6 aprobado para su uso por vía oral (Febrero 2015), basándose en los resultados obtenidos del ensayo en Fase III PALOMA-2⁹⁹. Más tarde se amplió la aprobación para el uso combinado de palbociclib y fulvestrant (inhibidor del receptor de estrógenos) en el ensayo clínico PALOMA-3 (NCT01942135)¹⁰⁰. Los programas de dosificación actuales muestran una buena tolerancia general solo con efectos secundarios leves, que incluyen fatiga, diarrea, náuseas y anemia ¹⁰¹. El aumento de la expresión de ciclina D1 y pRB y la disminución de p16INK4A están relacionados con la sensibilidad a palbociclib, como lo muestran los estudios preclínicos en células de cáncer de mama HR⁺. Estas alteraciones en los tumores de los pacientes podrían ser empleadas como biomarcadores predictores de respuesta a la inhibición de CDK4/6 ¹⁰². También se ha planteado que el palbociclib podría tener actividad antimetástasica, ya que en líneas celulares de cáncer de mama, esta pequeña molécula demostró inhibir procesos de

Introducción

migración e invasión tumoral¹⁰³. Actualmente dos ensayos clínicos PALLAS (NCT02513394) y PATINA (NCT02947685) examinan la potencialidad de palbociclib en mujeres con cáncer de mama positivo para el receptor 2 del factor de crecimiento epidérmico humano (HER2 +) ¹⁰⁴.

Ribociclib fue el segundo inhibidor de CDK4/6 aprobado para el tratamiento (por vía oral) de cáncer de mama avanzado HR + junto con letrozol (inhibidor de aromataza) en el estudio de fase III MONALEESA-2 (NCT01958021). En este estudio se demostró un beneficio en la supervivencia libre de progresión. Además, las toxicidades más comunes observadas fueron similares a las encontradas con palbociclib. Actualmente existen estudios en curso como el MONALEESA-3 (NCT02422615), que investiga la eficacia y seguridad de la combinación de ribociclib con fulvestrant ¹⁰³ y el MONALEESA-7 (NCT02278120) que estudia el efecto de ribociclib en mujeres premenopáusicas junto con tamoxifeno (modulador selectivo de estrógenos) ¹⁰⁴.

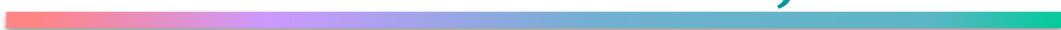
Abemaciclib, tiene una mayor potencia y una mayor especificidad para CDK4/6 en los modelos farmacocinéticos preclínicos en comparación con palbociclib y ribociclib ^{105,106}, aunque aún no hay datos clínicos que demuestren este hecho. En contraste con los dos anteriores inhibidores, abemaciclib se administra en un programa de dosificación continua ^{100,104}. La toxicidad limitante de la dosis con palbociclib y ribociclib es la neutropenia, mientras que con abemaciclib es la fatiga. Los efectos gastrointestinales como la diarrea, las náuseas y el dolor abdominal, son las toxicidades más frecuentes reportadas con abemaciclib. Los científicos están tratando activamente de dilucidar los mecanismos detrás de las toxicidades no hematológicas encontradas por el tratamiento con abemaciclib. Además de CDK4 y CDK6, la capacidad, exclusiva de abemaciclib, de inhibir a CDK9, una CDK reguladora de la transcripción génica, puede explicar el perfil de toxicidad específico y los eventos adversos gastrointestinales ¹⁰⁷.

Trilaciclib es un inhibidor de acción corta de CDK4/6 administrado por vía intravenosa, utilizado como co-tratamiento en pacientes con cáncer para reducir la mielosupresión (perdida de función de la médula ósea) inducida por la quimioterapia. Trilaciclib se está evaluando en pacientes con cáncer de pulmón de células pequeñas (CPCP) sin tratamiento previo (NCT02499770). Hay otros tres ensayos en curso de trilaciclib: un ensayo en pacientes con CPCP previamente tratados con quimioterapia (NCT02514447), un ensayo en cáncer de mama triple negativo (NCT02978716) y un ensayo en combinación con Atezolizumab (Tecentriq) en pacientes con CPCP (NCT03041311) ¹⁰⁸.

Por todo esto los inhibidores de CDK4/6 están demostrando ser una opción efectiva y prometedora para el tratamiento de algunos tipos de cáncer (cáncer de mama avanzado o metastásico HR+). Las futuras direcciones de investigación incluyen, la búsqueda de biomarcadores de respuesta y determinar si la inhibición de CDK4/6 debe emplearse en otros tipos tumorales, como el CU, ya sea solo o en combinación con otro agente.

La investigación del cáncer cada vez se centra más en dianas terapéuticas moleculares como opción de tratamiento no quirúrgico, mejorando la supervivencia del paciente y la prevención de la recurrencia del tumor. El empleo de nuevas tecnologías de investigación básica y preclínica mediante el uso de líneas celulares y animales de laboratorio basadas en los resultados obtenidos de la caracterización de muestras de pacientes, es una estrategia que ya ha dado frutos en oncología. El presente trabajo pretende su uso, para la identificación de moléculas claves en el desarrollo de tumores de vejiga.

OBJETIVOS



Objetivos

El objetivo principal de esta tesis doctoral es evaluar si un inhibidor de CDK4/6, palbociclib, es efectivo para el tratamiento de cáncer urotelial. Así pues, para su cumplimiento se plantearon los siguientes objetivos:

- I. Evaluación del efecto terapéutico del inhibidor de CDK4/6 (palbociclib) *in vitro* e *in vivo*, utilizando líneas celulares de cáncer urotelial con alteraciones genéticas conocidas, que corresponden a CUNMI o CUMI.
- II. Identificación de los mecanismos de acción de palbociclib en líneas celulares de cáncer urotelial, y su relevancia en cáncer urotelial humano.
- III. Evaluación del efecto terapéutico de palbociclib junto con el quimioterápico cisplatino, *in vitro* e *in vivo*.
- IV. Caracterización del tratamiento combinado de palbociclib y cisplatino en un modelo de ratón transgénico de cáncer urotelial avanzado.

MATERIALES Y MÉTODOS



Materiales y métodos

1. Recolección de muestras.

1.1. Muestras humanas.

Se analizaron muestras tumorales y registros médicos de 87 pacientes diagnosticados con neoplasia de vejiga (los datos patológicos y clínicos se presentan en el **Anexo I**). De cada uno de los pacientes se recogieron biopsias pareadas de parte tumoral y mucosa normal de la vejiga durante la práctica de la resección transuretral (RTU). Todas las muestras se mantuvieron en *RNAlater™ Stabilization Solution* (Thermo Fisher Scientific) a 4°C las primeras 24 horas y posteriormente congeladas a -20°C. Todos los pacientes dieron su consentimiento firmando un formulario adecuado al estudio aprobado por el Comité Ético para la Investigación Clínica del Hospital Universitario “12 de Octubre” (CEIC 10/50). Los pacientes incluidos en este proyecto fueron evaluados en el Departamento de Urología del Hospital Universitario 12 de Octubre entre los años 2009 y 2011. El estado histopatológico de las muestras fue confirmado por el Departamento de Anatomía Patológica del Hospital Universitario 12 de Octubre, siguiendo las últimas directrices de la Organización Mundial de la Salud y la clasificación TNM para tumores malignos. Datos prospectivos tales como la recurrencia del tumor (la aparición de un nuevo tumor en el mismo paciente después de la RTU) y la progresión (el estadio/grado del tumor en la recurrencia mayor respecto al tumor primario) también fue determinada. Todos los pacientes fueron seguidos dentro de un programa local de acuerdo con las pautas de la Asociación Europea de Urología (EAU). Para los análisis de inmunohistoquímica se emplearon cortes de los tumores fijados en formol e incluidos en bloques de parafina. Las muestras, fueron fijadas en formalina (10%) e incorporadas en parafina, y se incluyeron en dos TMA (del inglés, *Tissue Microarrays*) separados (1,5 mm de diámetro central), con al menos dos núcleos

Materiales y Métodos

duplicados representativos por cada muestra. Ambos se construyeron con un dispositivo manual de tejidos (Beecher Instruments, Sun Prairie, WI) utilizando el método estándar. Los TMA se tiñeron con hematoxilina y eosina y fueron revisados para confirmar la presencia de tejido tumoral representativo (al menos el 70% de las células tumorales).

1.2. Muestras de ratón.

Los ratones se mantuvieron con una dieta estándar para roedores (con comida y agua *ad libitum*) y bajo ciclos de 12 horas de luz y 12 horas de oscuridad. Todos los procedimientos experimentales se realizaron de acuerdo con las leyes y regulaciones Europeas y Españolas (Convenio Europeo ETS 123 sobre la protección de los animales vertebrados utilizados con fines experimentales u otros fines científicos; Real Decreto 53/2013 por el que se establecen las normas básicas aplicables para la protección de los animales utilizados en experimentación y otros fines científicos, incluyendo la docencia), y fueron aprobados por el Comité Ético del CIEMAT (OEBA-CIEMAT), por el Órgano Habilitado y por la autoridad competente (Consejería de Medio Ambiente, Administración Local y Ordenación del Territorio, Comunidad de Madrid; PROEX 183/15 para los xenoinjertos ortotópicos de células de vejiga humanas y PROEX 088/15 para todos los experimentos relacionados con los animales transgénicos CKO). Los ratones fueron sacrificados en una cámara de CO₂, siguiendo las regulaciones de FELASA y del OEBA-CIEMAT, cuando alcanzaron los criterios establecidos de punto final. Tras la eutanasia de los animales se procedió a la toma de muestras:

1.2.1. Para el análisis histológico.

Las muestras se fijaron en formaldehído tamponado (pH 7) al 3,7-4% o en etanol al 70%. Tras 24 horas, las muestras fijadas en formaldehído se lavaron con agua, se pasaron a etanol al 50% durante dos horas y se conservaron en etanol al 70% hasta el momento de la inclusión en parafina.

1.2.2. Para la extracción de proteínas.

Las muestras se congelaron en nitrógeno líquido y se conservaron a -80°C hasta el momento de la extracción.

1.2.3. Para la extracción de RNA.

Todas las muestras se mantuvieron en *RNAlater™ Stabilization Solution* (Thermo Fisher Scientific) a 4°C las primeras 24 horas y posteriormente congeladas a -80°C.

2. Líneas celulares y medios de cultivo.

Las líneas celulares de cáncer de vejiga (RT112, J82, 253J, 5637, UM-UC-1 y RT4), con características genómicas conocidos **Tabla 1**¹⁰⁹, fueron proporcionados por el Dr. FX Real (CNIO, España). El mantenimiento en cultivos de las células se llevó a cabo en medio Dulbecco Modificado Medio Eagle GlutaMAX™ (Gibco-BRL Life Technologies) con suero bovino fetal al 10% (Hyclone, Gibco-BRL Life Technologies) y 1% de antibiótico-antimicótico (Gibco-BRL Life Technologies) a 37°C en una atmósfera humidificada de 5% CO₂. Todas las células se cultivaron en placas de plástico estándar para el cultivo de tejidos (Corning). Asimismo, todas las células se lavaron con PBS (Tampón fosfato salino, Sigma Aldrich) y se separaron de las placas de cultivo mediante una solución de Tripsina/EDTA (Sigma Aldrich).

Línea celular	<i>TP53</i>	<i>RB1</i>	<i>EZH2</i>	<i>EHMT2</i>	<i>KDM5A</i>	<i>ARID1A</i>	<i>KDM6A</i>	<i>PIK3CA</i>	<i>FGFR3</i>
RT112	R248Q/S183*	wt	wt	wt	wt	wt	P1191fs	wt	wt
RT4	wt	wt	wt	wt	wt	3'UTR	wt	wt	wt
5637	R280T	Y325*	wt	wt	W139*	wt	wt	wt	wt
J82	E271K	I703_splice	wt	wt	wt	wt	C1413Y	P124L	K652E
253J	wt	wt	wt	wt	wt	wt	wt	E545G	wt
UM-UC-1	P152S	wt	wt	wt	wt	wt	Q1281*	wt	wt

Tabla 1. Resumen de las mutaciones relevantes en las líneas celulares de CU utilizadas.

wt= *wild type* (Tipo natural)

3. Agentes farmacológicos

El inhibidor de CDK4/6 palbociclib (PD0332991, Ibrance) fue proporcionado por Pfizer SLU España (CPT Grant ID: WI235560). La solución stock se preparó mediante disolución del soluto en agua (Sigma Aldrich) a una concentración de 2 mg/ml (3,5 mM). El quimioterápico cisplatino fue obtenido en Selleckchem. La solución stock a una concentración de 1 mg/ml (3,33 mM) se formuló en agua (Sigma Aldrich). Ambas soluciones stock se mantuvieron congeladas a -20°C. Consecuentemente, en todos los experimentos se empleó agua como vehículo control. Las diluciones de trabajo utilizadas se prepararon frescas para su uso inmediato.

4. Ensayo de citotoxicidad

La IC₅₀ es la concentración de un compuesto necesaria para reducir *in vitro* el crecimiento poblacional en un 50 por ciento. Para realizar los ensayos de viabilidad celular y el cálculo de la IC₅₀, las células se sembraron en placas de 96 pocillos a una densidad de 5.000 células por pocillo. Después de 24 horas de cultivo, las células se trataron con un intervalo de concentraciones de palbociclib y/o cisplatino durante 24 horas. Para los ensayos combinados de palbociclib con cisplatino, se siguió el método de Chou-Talalay utilizando una relación constante de ambos compuestos¹¹⁰⁻¹¹². La viabilidad celular se evaluó mediante el empleo un kit colorimétrico basado en la metabolización de la sal de tetrazolio XTT (Cell Proliferation Kit II (XTT); Roche). El método se basa en la adición en el medio de cultivo de una solución de sales de tetrazolio que son metabolizadas a formazán (un compuesto soluble y cuantificable a 450 nm). Este proceso solo ocurre en células viables, y la cantidad de formazán en el medio correlaciona directamente con el número de células metabólicamente activas. Los valores de absorbancia a 450 nm se midieron a 2, 4 y 6 horas después de añadir el reactivo XTT. La absorbancia se midió empleando un lector de microplacas GENios pro (Tecan). La absorbancia de fondo (medio solamente) fue restada de todos los valores. Los datos (media de seis-diez repeticiones de cada concentración de

fármaco) se normalizaron por el porcentaje de control del vehículo. Todos los ensayos de proliferación se realizaron, al menos, por triplicado en experimentos independientes.

5. Plásmidos y vectores

5.1. Plásmidos y vectores lentivirales utilizados.

Para la expresión recombinante de FOXM1 se empleó un plásmido, pLVX-FOXM1, proporcionado por el Dr. A. Gandarillas (IDIVAL, España), que contiene el ADN complementario de FOXM1 bajo el promotor del virus citomegalovirus (CMV) y que codifica también para una proteína que confiere resistencia al antibiótico puromicina (**Anexo II**).

Para el silenciamiento de FOXM1 se emplearon partículas lentivirales obtenidas en MISSION® shRNA Lentiviral Particles (Sigma Aldrich) (**Figura 9**) y que, al igual que en el vector antes mencionado aporta a las células infectadas resistencia a puromicina.

ShARN1 (TRCN000015544, Clon ID: NM_021953.2-374s1c1)

5'-CCGGGCCCAACAGGAGTCTAATCAACTCGAGTTGATTAGACTCCTGTTGGGCTTTTT-3'

ShARN2 (TRCN000015546, Clon ID: NM_021953.2-789s1c1)

5'-CCGGGCCCAATCGTTCTCTGACAGAACTCGAGTTCTGTCAGAGAACGATTGGCTTTTT-3'

Figura 9. Secuencias de los shARNs específicos de FOXM1. Se indica el *Track number* (TRCN) y el clon seleccionados en Sigma Aldrich. Se representan las cadenas en sentido 5'-3' de cada shARN. En azul se indican los nucleótidos correspondientes a la región horquilla del shARN.

Para el silenciamiento de CDK2, CDK4 y pRB1 se emplearon los vectores lentivirales de segunda generación pLVTHM-shCDK2, pLVTHM-shCDK4 y pLVTHM-shRB1 (a partir de ahora nombrados como shCDK2, shCDK4, shRB) proporcionados por el Dr. S. Ruíz (CNIO, Madrid, España) todos ellos generados a partir de respectivas clonaciones en el vector lentiviral pLVTHM (**Anexo III**), que

Materiales y Métodos

contiene el gen que confiere resistencia a la ampicilina y el gen que codifica para la proteína GFP (**Figura 10**).

shCDK2

5'-CGCGTGCAGAATCTGCTTATTAACATTC**CAAGAG**ATGTTAATAAGCAGATTCTGCTTTTTTGGAA**AT**-3'

shCDK4

5'-CGCGTGCACCTTACACCGTGGTTGT**TTCAAGAG**ACAACCACGGGTGTAAGTGCCTTTTTTGGAA**AT**-3'

shRb

5'-CGCGTGTTCCTCTTCCAAAGTAAT**TTCAAGAG**ATTACTTTGGAAGAGGAACTTTTTTGGAA**AT**-3'

Figura 10. Secuencias de los shARNs específicos de CDK2, CDK4 y pRB1. Se representan las cadenas en sentido 5'-3' de cada shARN. En azul se indican los nucleótidos correspondientes a la región de la horquilla del shARN y en naranja se indican los nucleótidos correspondientes a los sitios de corte de las enzimas de restricción MluI y ClaI para su posterior clonaje en el vector pLVTHM.

La amplificación del plásmido FOXM1 y los vectores lentivirales de CDK2, CDK4 y pRB se realizaron en bacterias *E.coli* de la cepa XL-Blue. Los cultivos bacterianos se llevaron a un volumen de 250 ml de medio LB (Luria Broth, 10 g de Bacto Triptona, 5 g de extracto de levadura y 10 g de NaCl, Pronadisa) suplementado con ampicilina a una concentración final de 100 ng/μL, el cultivo se dejó crecer durante 16 horas a 37°C con una agitación de 200 r.p.m. La purificación del plásmido se realizó mediante el empleo del kit Plasmid Maxi (Macherey Nagel) siguiendo las instrucciones del fabricante.

5.2. Generación de vectores lentivirales

Para la producción de los vectores lentivirales shCDK2, shCDK4 y shRB se emplearon las células empaquetadoras 293T, adquiridas de la ATCC (del inglés, *American Type Culture Collection*). Las células 293T se cultivaron en medio Dulbecco Modificado Medio Eagle GlutaMAX™ (Gibco-BRL Life Technologies) con suero bovino fetal al 10% (Hyclone) y 1% de antibiótico-antimicótico. Los plásmidos se transfectaron en las células 293T mediante el empleo de polietilenimina (a una concentración final de 130 nM; Polysciences). Para los lentivirus de segunda generación portadores de los shARNs, se emplearon los plásmidos empaquetadores

pMDLg/pRRE y pMD2. G. El medio de cultivo celular se renovó a las 6 horas después de la transfección de las células 293T. Después de 18 horas se recogió el sobrenadante de cultivo de las células transfectadas y se filtró (filtro de 0,45 µm de diámetro). Para realizar la infección retroviral este sobrenadante se añadió a las placas de cultivos de células diana durante 24 y 48 horas. Las células fueron seleccionadas mediante BD Influx™ Cell Sorter (BD Biosciences) usando el filtro láser 530/30 (láser de excitación línea de 488 nm) en base a la expresión de la proteína verde fluorescente (GFP, del inglés, Green fluorescent protein). Las líneas celulares se establecieron a partir de miles de células independientes infectadas por el virus.

5.3. Transfección/infección de líneas celulares.

Los experimentos de transfección para expresión exógena de la proteína FOXM1 se realizaron utilizando Fugene®6 reactivo de transfección (Promega), en un ratio de Fugene/DNA (6:2). Para el silenciamiento de FOXM1 se agregaron las partículas lentivirales con una multiplicidad de infección (MOI) igual a 10. La infección se realizó en placas de 24 pocillos sembradas a una densidad de 2.500 células por pocillo. La selección de crecimiento de las células transfectadas/infectadas se realizó durante al menos 15 días con puromicina en el medio de cultivo (Sigma Aldrich) a una concentración de 0.5-1 mg/ml. En todos los casos, se agruparon clones diferentes de células resistentes para la creación de estas nuevas líneas celulares.

6. Análisis de distribución del ciclo celular

El análisis del ciclo celular se realizó por citometría de flujo. Para ello, las células se cultivaron en placas de 12 pocillos a una densidad de 400.00 células por pocillo. A las 24 horas se añadió el compuesto químico a evaluar a una concentración correspondiente a la IC50 de cada línea celular. Pasadas 24 horas de tratamiento las células se recogieron, centrifugaron y resuspendieron en etanol frío al 70% (añadido gota a gota en agitación con vórtex). Todas las células se fijaron durante un mínimo

de 12 h a 4°C. Posteriormente se centrifugaron y lavaron con PBS. Tras un segundo lavado, se resuspendieron en una solución de PBS con DAPI (2 mg/ml, Roche) y NP40 (0,05%, Roche) durante al menos 2 horas a 4°C. Los datos fueron adquiridos con un citómetro de flujo LSR Fortessa (BD Biosciences) y analizados mediante el programa FlowJo 7.6.5 (Treestar). Estos ensayos se realizaron, al menos, tres veces con triplicados para cada muestra en experimentos independientes.

7. Análisis Inmunohistoquímico.

Los portaobjetos con las muestras a evaluar fueron desparafinados y rehidratados siguiendo protocolos estándar. El desenmascaramiento del antígeno se llevó a cabo mediante el empleo de un tampón de citrato sódico (ácido cítrico monohidratado $[\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_7]$ 1,8 mM y citrato trisódico dihidratado $[\text{Na}_3 (\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7) 2\text{H}_2\text{O}]$ 8,2 mM; pH 6) usando una olla a presión (Dako, Agilent Technologies). La peroxidasa endógena se inhibió con peróxido de hidrógeno al 0.3% disuelto en metanol durante 15 minutos. Los epítomos inespecíficos se bloquearon con suero de caballo al 10% disuelto en PBS (NaCl 137 mM, KCl 2,7 mM, Na_2HPO_4 4,3 mM y KH_2PO_4 1,47 mM; pH 7,2) durante 30 minutos a 37°C. Los anticuerpos primarios (listados abajo; **Tabla 2A**) se incubaron durante toda la noche a 4°C diluidos en la solución de bloqueo. Los anticuerpos secundarios (listados abajo; **Tabla 2B**), conjugados con biotina, se incubaron durante una hora a temperatura ambiente diluidos en la solución de bloqueo. Para amplificar la señal, se empleó un sistema conjugado de biotina-avidina-peroxidasa (VECTASTAIN elite ABC HRP kit, Vector Laboratories), incubándose durante 30 minutos a temperatura ambiente. La señal se visualizó usando diaminobencidina como sustrato de la peroxidasa (DAB Kit, Vector Laboratories). Todos los lavados se llevaron a cabo con PBS (3 lavados de 10 minutos entre cada paso). Finalmente, las muestras se contratiñeron con hematoxilina, se deshidrataron empleando procedimientos estándar y se montaron usando un adhesivo de montaje (CU Mount, Leica Biosystems). Las imágenes se tomaron con una cámara digital (Olympus DP21) acoplada a un microscopio óptico (Olympus) BX41).

A Anticuerpos primarios utilizados en Inmunohistoquímica				
Diana	Clon	Procedencia	Dilución	
BrdU	BMC9318	Roche 11170376001	1:20	
Cleaved Caspase-3 (Asp175)	-	Cell Signaling #9661	1:200	
FOXMI-P(Thr600)	D9M6G	Cell signaling 14655S	1:100	
Histone H3-P (Ser10)	-	Millipore. Cat. # 06-570	1:500	
Ki67	MM1	Novocastra. NCL-Ki67p	1:800	
EZH2	6A10	Abnova MAB9542	1:1000	
AKT-P (S473)	D9E	Cell Signaling 4060	1:500	
ERK1/2-P (Thr202/Tyr204)	D13.14.4E	Cell Signaling 4370	1:500	
Stat3-P (Tyr705)	-	Cell Signaling 9131	1:500	

B Anticuerpos secundarios utilizados en Inmunohistoquímica				
Diana	Clon	Conjugado	Procedencia	Dilución
Anti-Rabbit IgG	Donkey	Biotin-SP	JACKSON N° 711-065-152	1:1000
Anti-Mouse IgG	Donkey	Biotin-SP	JACKSON N° 715-035-151	1:1000

Tabla 2. Anticuerpos utilizados en inmunohistoquímica. A. Anticuerpos primarios. **B.** Anticuerpos secundarios

8. Extracción de proteína y análisis mediante western blot.

Los extractos proteicos de las líneas celulares fueron obtenidos mediante el raspado de las células en frío con PBS y su posterior resuspensión en un tampón de lisis (Hepes 20 mM pH 7,5, NaCl 100 mM, MgCl₂ 20 mM, EGTA 10 mM, β -glicerofosfato 40 mM, 1% de Triton X-100, PMSF 1 mM, inhibidores de proteasas 1X (complete Mini Protease Inhibitor Cocktail, Roche) e inhibidores de fosfatasa 1X (PhosSTOP, Roche). Para las muestras de tejido de ratón, los tejidos congelados con nitrógeno líquido fueron homogeneizados en un mortero, seguido de 5 ciclos de congelación en nitrógeno líquido y descongelación en baño a 37°C en el tampón de lisis. La concentración proteica se determinó usando el método colorimétrico Bradford (BioRad Laboratories).

Para el western blot de lisados tumorales, los extractos proteicos fueron reducidos y desnaturalizados con Bolt™ Sample Reducing Agent (10x) y LDS Sample Buffer (4x) (Thermo Fisher Scientific), y hervidas durante 10 minutos a 70°C. Para la electroforesis se cargaron 30 μ g de proteína total en geles de 10 pocillos de poliacrilamida a un porcentaje en gradiente del 4 al 12 % (NuPAGE Bis-Tris Gel –

Materiales y Métodos

Life Technologies-) con tampón MOPS (Invitrogen) a 150 mV. Se utilizó un marcador de peso molecular SeeBlue Plus2 (Life Technologies). El contenido proteico del gel se transfirió a una membrana de nitrocelulosa (GE Healthcare) en cámara húmeda durante una hora y media mediante la aplicación de una corriente eléctrica de 400 mA.

Para los westerns blot de lisados de líneas celulares, los extractos proteicos fueron reducidos y desnaturalizados (β -mercaptoetanol y tampón Laemmli (BioRad), en relación 1:9, e incubados durante 5 minutos a 95°C). Para realizar el análisis de expresión proteica en respuesta al tratamiento con palbociclib, las células se expusieron durante 6 horas a una concentración de 1 μ M de palbociclib. Para la electroforesis se cargaron 20 y 50 μ g de proteína total de cada muestra (dependiendo del ensayo) en geles de poliacrilamida de gradiente 4-15% (BioRad) usando un tampón de Tris/Glicina/SDS (Tris 25 mM, Glicina 192mM, SDS 0,1%; pH 8,3; BioRad). Se utilizó el marcador de peso molecular Precision Plus Protein™ Dual Color Standards (BioRad). A continuación, las muestras se transfirieron a membranas de nitrocelulosa (BioRad) empleando el sistema “Trans-Blot Turbo Transfer” de BioRad. Para ello se empleó un tampón de transferencia (BioRad) con un 20% de etanol absoluto. La transferencia se realizó usando el protocolo MIXED MW (2,5 A, 25 V, 7 minutos).

Una vez realizada la transferencia, las membranas se incubaron con un tampón de bloqueo (PBS con un 5% de leche en polvo desnatada y un 0,1% de Tween-20) durante una hora a temperatura ambiente en agitación. Los anticuerpos primarios (**Tabla 3A**) se incubaron durante toda la noche a 4°C en agitación diluidos en el tampón de bloqueo. Los anticuerpos específicos para, α -tubulina, β -actina y GAPDH se usaron como controles de carga. Los anticuerpos secundarios (**Tabla 3B**), conjugados con peroxidasa, se incubaron durante una hora a temperatura ambiente en agitación diluidos en el tampón de bloqueo. Se llevaron a cabo 3 lavados de 10 minutos con PBS tras la incubación de los anticuerpos. Para la detección de los

anticuerpos secundarios, se empleó el “Clarity Western ECL” (BioRad) y el Super Signal West Pico Chemiluminescent Substrate (Thermo Fisher Scientific) como sustrato de la peroxidasa, siguiendo las instrucciones del fabricante. La señal se visualizó mediante un detector de quimioluminiscencia (ChemiDoc MP System, BioRad).

A Anticuerpos primarios utilizados en Western Blot			
Diana	Clon	Procedencia	Dilución
Akt1/2	N-19	Santa Cruz SC 1619	1:500
AKT-P (S473)	EP2109Y	Abcam 81283	1:500
CDK2	M2	Santa Cruz sc-163	1:500
CDK4	-	Santa Cruz sc-260	1:500
CDK8	-	Abcam 2955	1:500
CDK9	-	Abcam 6544	1:500
Cyclin A	BF683	Santa Cruz sc-239	1:500
Cyclin B1	-	Santa Cruz sc-55	1:500
Cyclin D1	SP4	NeoMarkers RM- 9104 -S1	1:500
Cyclin E	HE12	Santa Cruz sc-247	1:500
E2F1	KH95	Santa Cruz sc-251	1:500
E2F3(a-b)	C-18	sc-878X	1:2000
ERK	K-23	Santa Cruz SC-94	1:1000
ERK1/2-P (Thr202/Tyr204)	D13.14.4E	Cell Signaling 4370	1:500
ERK-P	E-4	Santa Cruz sc-7383	1:500
EZH2	6A10	Abnova MAB9542	1:1000
EZH2(Thr487)	EPR1410	Abcam 109398	1:2000
FOXO1	D12D5	Cell Signaling 5436	1:500
FOXO1-P(Ser35)	-	Cell Signaling 14170	1:500
FOXO1-P(Thr600)	D9M6G	Cell signaling 14655S	1:500
p107	C18	Santa Cruz sc-318	1:500
p130	10/Rb2	BD Transduction 610262	1:500
p16	M-156	Santa Cruz sc-1207	1:500
p27	-	abcam ab7961	1:500
p53	CM5	Novocastra NCL-p53_CM5p	1:500
p-Rb Ser 807/811	-	Cell Signaling 9308	1:1000
PTEN	N-19	Santa Cruz SC 6818	1:200
Rb total	Clone G3-245	BD Pharmingen 554136	1:500
Stat3	79D7	Cell Signaling 4904	1:500
Stat3-P (Tyr705)	-	Cell Signaling 9131	1:500
β -Actina	I-19	Santa Cruz sc-1616	1:1000
GAPDH	FL-335	sc-25778	1:1000
α -Tubulina	clone B-5-1-2	Sigma T5168	1:10000

B Anticuerpos secundarios utilizados en Western Blot				
Diana	Clon	Conjugado	Procedencia	Dilución
Anti-Rabbit IgG	Donkey	HRP	GE Healthcare NA934	1:5000
Anti-Mouse IgG	Donkey	HRP	JACKSON N° 715-035-151	1:5000
Anti-Goat IgG	Donkey	HRP	Santa Cruz sc-2020	1:10000

Tabla 3. Anticuerpos utilizados en western blot. A. Anticuerpos primarios. B. Anticuerpos secundarios.

9. Extracción de ARN y RT-PCR cuantitativa.

Siguiendo las instrucciones del fabricante y dependiendo del tipo de muestra se realizaron distintas extracciones de ARN:

- Muestras de cultivos celulares. El ARN total de las líneas celulares fue obtenido mediante el raspado de las células en PBS a 4º y su consiguiente centrifugación 3 minutos a 2.500 rpm a 4º. Para realizar el análisis de expresión en respuesta al tratamiento con palbociclib, las células se expusieron durante 24 horas a una concentración de 10 µM de palbociclib. Una vez retirado el sobrenadante al pellet se le añadieron 700 µl de Qiazol (Qiagen). La extracción del ARN total se realizó mediante columnas del kit miRNeasy Mini (Qiagen) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. El ADN fue eliminado mediante el uso del kit RNase-Free DNase Set (Qiagen).
- Muestras procedentes de tumores de pacientes embebidas en *RNAlater™ Stabilization Solution*. El ARN total fue aislado a partir de fragmentos tumorales no mayores de 0.5 cm, que seguidamente fueron fragmentarlo con bisturí sobre un portaobjetos. Una vez fragmentado se añadió 700 ul de Qiazol Lysis Reagent y una perla de acero de 5 mm (QIAGEN). Seguidamente, las muestras se trataron con un homogeneizador Biometa (Retsch) a una frecuencia de 40/s durante 4 minutos. A partir de este último paso la extracción del ARN total se realizó mediante columnas del kit miRNeasy Mini (Qiagen) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. El ADN fue eliminado mediante el uso del kit RNase-Free DNase Set (Qiagen).

- Muestras procedentes de tumores de pacientes desde secciones de tejido fijado en formaldehído y embebido en parafina. Para la obtención de ARN total las muestras fueron tratadas con la solución de desparafinización de Qiagen y el ARN se purificó usando las columnas del kit miRNeasy FFPE (Qiagen) de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

En todos los casos, el ARN purificado se cuantificó mediante un espectrofotómetro Nanodrop ND-1000. La reacción de transcripción inversa del ARNm para generar el ADN complementario se llevó a cabo a partir de 1 µg de ARN, empleando para ello el Kit Omniscript RT (Qiagen). Para la retrotranscripción de los microARNs, se emplearon 10 ng de ARN total por reacción y se usó el kit MicroRNA Reverse Transcription (Applied Biosystems). Ambas reacciones se llevaron a cabo de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

La RT-PCR cuantitativa fue realizada con los sistemas 7500 Fast Real Time PCR y QuantStudio 6 Flex Real-Time PCR System (Thermo Fisher Scientific) y se utilizó el programa de amplificación estándar. Para los análisis de expresión de ARNm se empleó la GoTaq PCR Master Mix (Promega). Se empleó 1 µl de ADN complementario por reacción y cebadores específicos para cada gen a una concentración final de 0,5 µM (**Tabla 4**). El gen *TBP* se utilizó como gen de referencia para la normalización. Se realizaron curvas de desnaturalización (Curvas de melting) para verificar la especificidad de la amplificación y la ausencia de dímeros de cebadores. Las eficiencias de las reacciones se calcularon para cada combinación de cebadores.

Tabla X . Cebadores utilizados para la RT-PCR cuantitativa			
Cebador directo	Secuencia	Cebador inverso	Secuencia
TBP-F	5'-AGTGAAGAACAGTCCAGACTG-3'	TBP-R	5'-CCAGGAAATAACTCTGGCTCAT-3'
FOXMI-F	5'-ACTTTAAGCACATTGCCAAGC-3'	FOXMI-R	5'-CGTGCAGGGAAAGGTTGT-3'

Tabla 4. Cebadores utilizados en RT-PCR cuantitativa.

10. Análisis masivo de expresión génica.

Para los análisis masivos de expresión génica se utilizaron dos tipos muestrales: cultivos celulares y muestras tumorales procedentes de ratones. Las células RT-112, J82 y 5637 fueron tratadas con una concentración de palbociclib (IC50) durante 24 h, en el caso de los controles se utilizó PBS. De cada línea celular se obtuvieron 3 muestras independientes. El ARN de las células fue extraído como se describe en el apartado 9 de esta sección. En el caso de las muestras de ratones transgénicos, la extracción de ARN se realizó a partir de micro-disecciones de los tumores observados histológicamente para limitar al mínimo el contenido de tejido no tumoral. El ARN total se extrajo usando el kit de miRNeasy FFPE (Qiagen) como se ha explicado anteriormente.

Para los análisis de expresión génica diferencial un total de 12 ng de ARN se transformó en ADNc y se amplificó mediante PCR. A partir de este producto de PCR se llevó a cabo una transcripción *in vitro*, el ARNc producido fue purificado y cuantificado para llevar a cabo una segunda reacción de retrotranscripción. Este último ADNc fue fragmentado, biotinilado e hibridado en los “*microarrays*” de ADN HTA 2.0 de Affymetrix, en el caso de los cultivos celulares, y en los “*microarrays*” de raton Clariom D Assay Mouse. Todo el protocolo fue realizado según las instrucciones del fabricante (GeneChip WT Pico Reagent Kit, Thermo Fisher Scientific). En ambos casos, los “*microarrays*” se lavaron y se tiñeron en GeneChip 450 (Affymetrix). La lectura de los chips se llevó con el escáner GeneChip 3000 7G, los análisis de imágenes de los chips con el Affymetrix GeneChip Command Console. Los datos obtenidos se depositaron en la base de datos Gene Expression Omnibus (GEO) con el código GSE105402, para el caso de los cultivos celulares, y con el código GSE100716, para el caso de las muestras procedentes de los ratones.

11. Experimentación animal

11.1. Xenoinjertos en flanco.

Para la realización de los xenoinjertos las líneas celulares fueron resuspendidas en PBS e inyectadas con matrigel (Basement Membrane Matrix High Concentration) en un ratio 1:1. Se inyectaron subcutáneamente 5 millones de células en un volumen total de 100 μ l en cada flanco de 20 ratones inmunodeficientes FoxN^{nu/nu} de aproximadamente 8-10 semanas de edad (Janvier Saint-Berthevin, Francia). Después de una semana de la inyección, los tumores ya eran visibles. El crecimiento tumoral se siguió midiendo tres veces por semana mediante un calibre electrónico. El volumen de los tumores se calculó como $4\pi/3 \times (\text{longitud}/2) \times (\text{anchura}/2)^2$. Para la cuantificación relativa del incremento del tumor, se relativizó cada tumor con su tamaño inicial, antes de los tratamientos. Cuando el volumen del tumor estuvo entre 150-250 mm³ los ratones se asignaron al azar en 4 grupos (n = 5) para recibir los diferentes tratamientos: vehículo (PBS), palbociclib, cisplatino y palbociclib más cisplatino. Palbociclib (disuelto en PBS) se administró intraperitonealmente a una concentración de 100 mg/kg durante 5 días a la semana. El cisplatino (disuelto en PBS) se inyectó por vía intraperitoneal 1 día por semana a una dosis de 6 mg/kg. Adicionalmente, el tratamiento combinado con palbociclib y cisplatino consistía en una combinación de los tratamientos anteriormente mencionados. Las concentraciones de palbociclib y cisplatino fueron elegidas en base a los datos publicados previamente ^{113,114}. Después de 15-30 días de tratamiento, los ratones fueron sacrificados. Las muestras tumorales fueron conservadas PBS-formalina al 4% o en Etanol al 70% para los experimentos de inmunohistoquímica y en nitrógeno líquido para análisis de proteínas western blot.

11.2. Modelo CKO

Para el ensayo del efecto de las drogas *in vivo* se utilizó el modelo transgénico cuádruple “knockout” (CKO): *Rb11*^{-/-}, *Rb1*^{F/F}, *Trp53*^{F/F}, *Pten*^{F/F}, generado por nuestro grupo de investigación¹¹⁵. Este modelo permite la delección condicional de tres genes supresores tumorales en un fondo genético sin presencia de *Rb11*. La delección de los genes *Rb1*, *Trp53* y *Pten*, se produjo mediante la aplicación de la tecnología Cre-loxP. Este sistema Cre-loxP consiste en la introducción de secuencias loxP flanqueado la secuencia genómica a escindir, de manera que cuando la Cre-recombinasa reconoce estas secuencias loxP se produce el corte de la secuencia diana. Para producir la delección de nuestros tres genes supresores de tumor *Rb1*, *Trp53* y *Pten* en la vejiga se introdujo quirúrgicamente un adenovirus que porta la proteína Cre-recombinasa bajo el control del promotor de la queratina K5¹¹⁶ (en lo sucesivo, Adeno-K5-Cre) en el lumen de la vejiga de ratones^{117,118}. El virus Adeno-K5-Cre se obtuvo de la Unidad de Producción de Vectores Virales de la Universidad Autónoma de Barcelona. El efecto de la proteína Cre-recombinasa fue detectado exclusivamente en células uroteliales basales según lo evaluado en el modelo de animal transgénico ROSA 26 (B6.129S4-Gt (ROSA) 26Sortm1Sor/J). El modelo animal ROSA26 ha sido modificado con la inserción del gen β -galactosidasa en el locus ROSA, pero precedido por un codón de parada flanqueado por secuencias loxP. La escisión de estas secuencias por la Cre-recombinasa, restaura la expresión, produciendo una coloración azul estable e insoluble en presencia del sustrato X-Gal¹¹⁹. Para el seguimiento de la aparición de tumores se realizó una revisión rutinaria mediante inspección visual, palpación abdominal¹¹⁸. En el momento del sacrificio, se recogieron los tejidos y se procesaron como se ha mencionado antes en el punto 1.1 de Mat. y Met.

12. Análisis Estadístico

Los ensayos de ciclo celular se realizaron al menos, tres veces con triplicados para cada muestra en experimentos independientes. Las diferencias estadísticas se determinaron mediante el test de *Wilcoxon-Mann-Whitney* (para muestras no pareadas sin distribución normal) y la prueba t de Student (para muestras pareadas que muestran una distribución normal). Los análisis de supervivencia (libre de recurrencia o de progresión tumoral en la recurrencia) de acuerdo con diversas variables se realizaron usando el método de Kaplan-Meier. Las diferencias entre los grupos fueron analizadas por el test de Log-rank. Los análisis de contingencia se realizaron utilizando el Test exacto de Fisher. Las asociaciones entre la expresión FOXM1 fosforilada y los parámetros demográficos y clínico-patológicos se evaluaron usando la prueba χ^2 . Se utilizó el análisis de riesgos proporcionales de Cox univariable y multivariable para calcular los cocientes de riesgos (FC) y los intervalos de confianza (IC) del 95%. La discriminación entre muestras que aumentan o disminuyen la expresión relativa frente a la expresión normal de genes se hizo mediante la mediana de los datos. Para evaluar el efecto del tratamiento dual con palbociclib y cisplatino, los experimentos de combinación de fármacos se diseñaron según lo descrito por Chou-Talalay ¹¹⁰ y los datos resultantes se analizaron con el software CompuSyn. Se consideró un efecto sinérgico cuando el índice de combinación (IC) estaba por debajo de 1. Para el análisis estadístico y la generación de los gráficos se emplearon los softwares SPSS 17.0 y Prism 6.0.

12.1. Tratamiento de los datos y análisis bioinformáticos de los “microarrays” de expresión

Los datos de expresión se normalizaron utilizando el Guanine Cytosine Count Normalization (GCCN) y el Signal Space Transformation (SST). Seguido se utilizó el Robust Multi-Array Average (RMA), algoritmo implementado dentro del software Affymetrix Expression Console (Affimetrix). Para combinar los diferentes grupos de datos y corregir las posibles variaciones técnicas se utilizó el paquete Bioconductor

Materiales y Métodos

Combat, basado en el lenguaje de programación R ¹²⁰. La agrupación jerárquica supervisada se realizó utilizando la correlación de Pearson usando el software TMEV ¹²¹. El análisis ontológico de los genes y el análisis de enriquecimiento de estos se realizaron con la herramienta web Enrich (<http://amp.pharm.mssm.edu/Enrichr/>) ^{122,123}. El análisis de enriquecimiento en grupos de genes (del inglés, Gene Set Enrichment Analysis, GSEA) permite averiguar qué genes o grupos de genes diferencialmente expresados en nuestro estudio aparecen significativamente representados en diferentes firmas génicas publicadas, las cuales proceden de la base de datos MSigDB (colección “c2.cpg.v3.0”) (<http://www.broadinstitute.org/gsea/msigdb/index.jsp>) ¹²⁴.

RESULTADOS

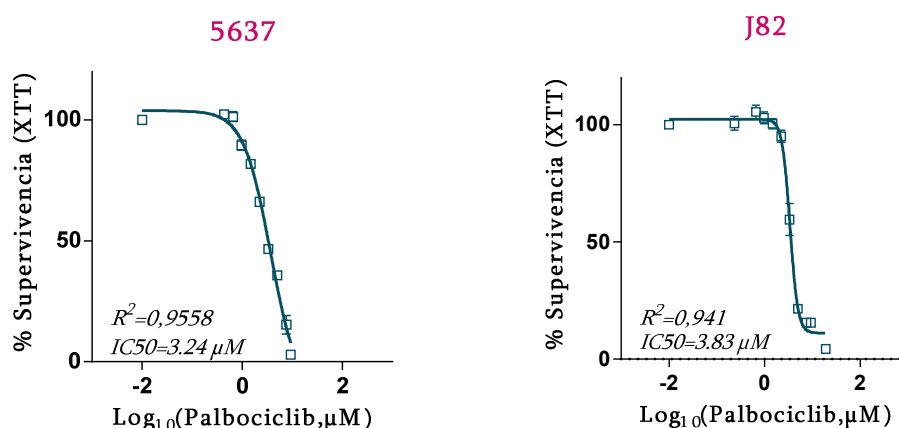


Resultados

1. Estudio del efecto de palbociclib en líneas celulares de cáncer de vejiga.

1.1. Estudio de la sensibilidad de las diferentes líneas celulares a palbociclib.

Entre los distintos agentes existentes encaminados a frenar la proliferación celular anómala se encuentran los inhibidores de CDK4/6. Estos inhibidores inducen el bloqueo del ciclo celular en la transición G1-S mediante el mantenimiento de la actividad represora de pRB. Con el objetivo de evaluar el efecto citotóxico del compuesto palbociclib (inhibidor dual de CDK4/6) sobre un panel de líneas celulares de cáncer de vejiga, se realizaron ensayos de viabilidad celular mediante el método de XTT, evaluando la respuesta a distintas dosis y tiempos de exposición a este compuesto. Se analizaron seis líneas celulares de cáncer de vejiga con diferencias genómicas conocidas; 5637, J82, RT-112, 253J, UM-UC-1 y RT-4, representativas de distintos estadios tumorales y subtipos de cáncer de vejiga (ver tabla Mat. y Met.)¹⁰⁹. Como se puede observar en la **Figura 11**, todas las líneas celulares mostraron sensibilidad al inhibidor de CDK4/6 en un rango de 1-5 μM , concentraciones similares a las reportadas para otros tipos de células tumorales ¹²⁵.



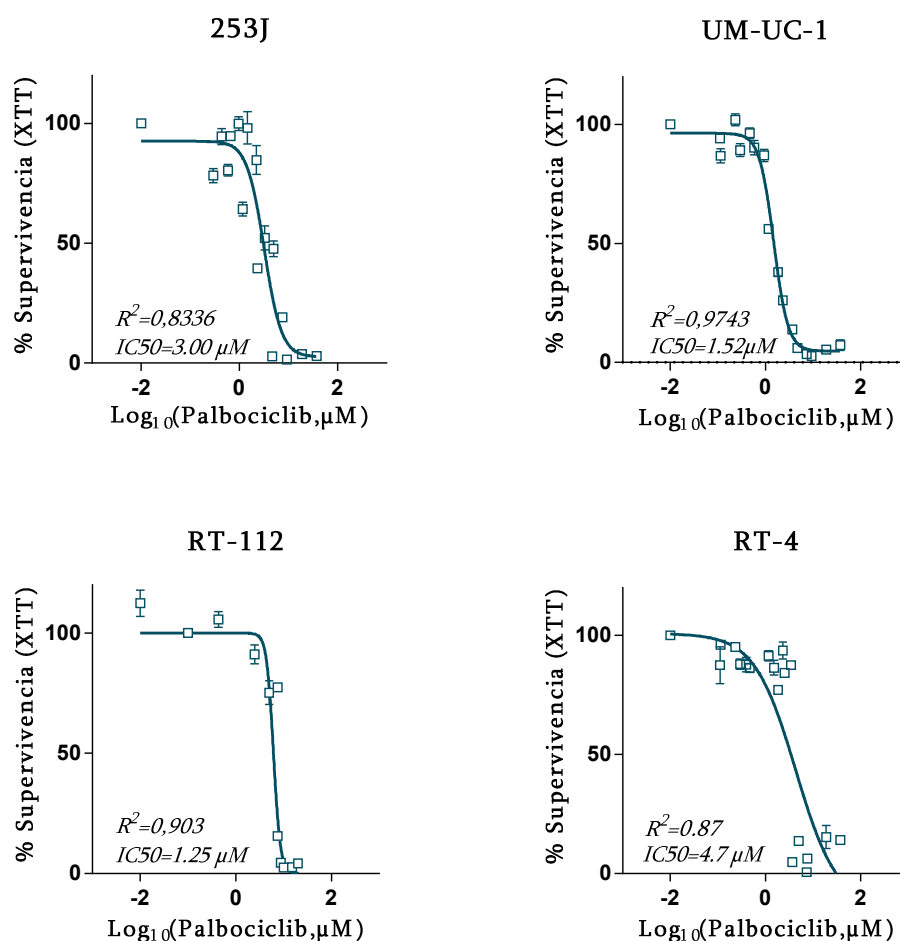


Figura 11. Ensayos de supervivencia de las líneas celulares de cáncer de vejiga a 24 horas de tratamiento con palbociclib. Representación gráfica que muestra la supervivencia celular de las seis líneas celulares evaluadas frente a la concentración del compuesto. Los nombres en rojo denotan las líneas celulares con mutación en *RBI* y los nombres en negro las líneas celulares sin mutación. Los datos son el promedio \pm SEM de 5-10 experimentos en los que cada dosis se realizó por sextuplicado.

Los inhibidores de CDK4/6 están siendo utilizados como tratamiento de un gran número de tumores sólidos malignos, caracterizados por la presencia de alelos nativos (*wt*, del inglés “*wild type*”) del gen *RBI*. La diana principal de la actividad de CDK4/6 es pRB y algunos datos preclínicos han demostrado que la desregulación de genes y proteínas implicados en el control del ciclo celular está asociada con la

resistencia a palbociclib, incluyendo el aumento de expresión de la ciclina E1 y la pérdida de pRB¹²⁶.

Nuestro panel de líneas celulares se puede dividir según el estatus mutacional del gen *RB1* en: líneas mutantes (mut) (5637 y J82), y líneas con alelos *wt* (RT-112, RT-4, UM-UC-1 y 253J). En los ensayos de sensibilidad farmacológica no se observaron diferencias significativas cuando se compararon los diferentes tipos celulares pertenecientes a cada grupo, *RB1* mut y *RB1* wt (**Figura 12**).

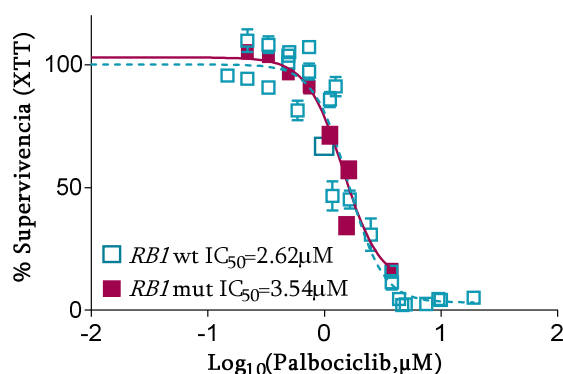


Figura 12. Ensayos de supervivencia de las líneas celulares de cáncer de vejiga agrupadas según el estatus del gen *RB1* a 24 horas de tratamiento con palbociclib. Representación gráfica que muestra la supervivencia celular de las líneas mutantes y *wt* para el gen *RB1* frente a la concentración del compuesto. Los datos representan la media \pm SEM de 5-10 experimentos en los que cada dosis se realizó por sextuplicado.

Con el objetivo de reforzar nuestros resultados, se realizó un análisis *in silico* con datos de sensibilidad a palbociclib de diferentes células tumorales uroteliales, así como con células derivadas de cáncer de pulmón (donde las mutaciones inactivantes de *RB1* son muy frecuentes), contenidas en *Cáncer Cell Line Encyclopedia* (<https://portals.broadinstitute.org/ccle>). Al igual que observamos con las líneas uroteliales en nuestro laboratorio, no encontramos diferencias significativas de sensibilidad a palbociclib entre las células *RB1* mut y las *RB1* wt de ambos tipos tumorales evaluados (**Figura 13**).

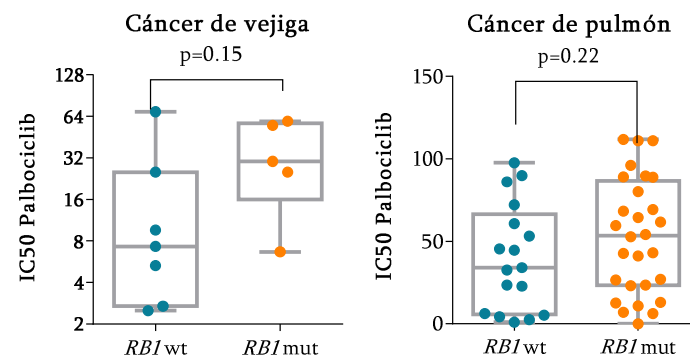
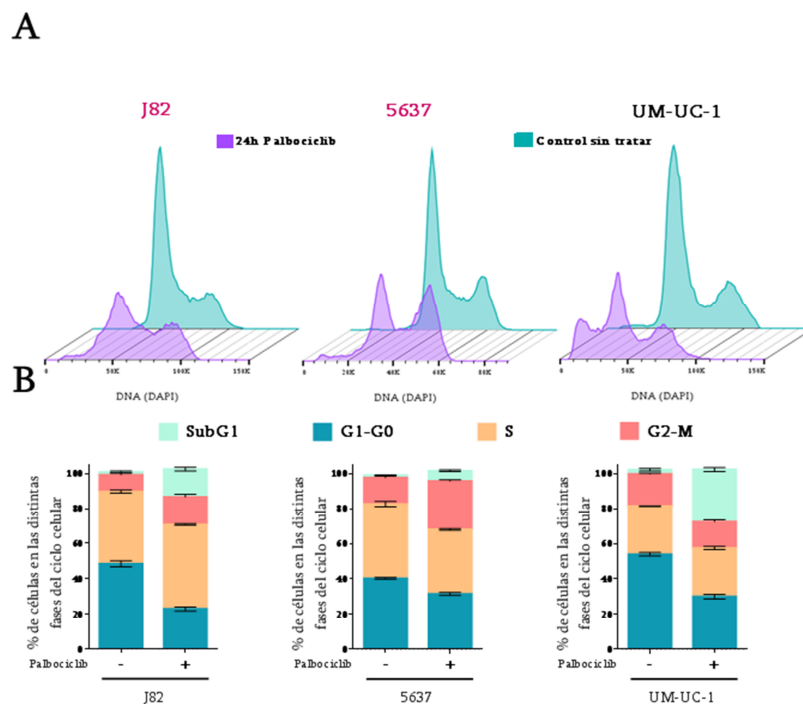


Figura 13. Análisis de la sensibilidad a palbociclib en líneas celulares procedentes de cáncer de vejiga y de cáncer de pulmón procedentes de *Cáncer Cell Line Encyclopedia* (<https://portals.broadinstitute.org/ccle>).

1.2. Efecto de palbociclib sobre el ciclo celular.

Para profundizar en el mecanismo de acción de este compuesto, se realizó un análisis del ciclo celular por citometría de flujo de las distintas líneas celulares tratadas con sus respectivas dosis (IC50) de palbociclib durante 24 horas (Figura 14).



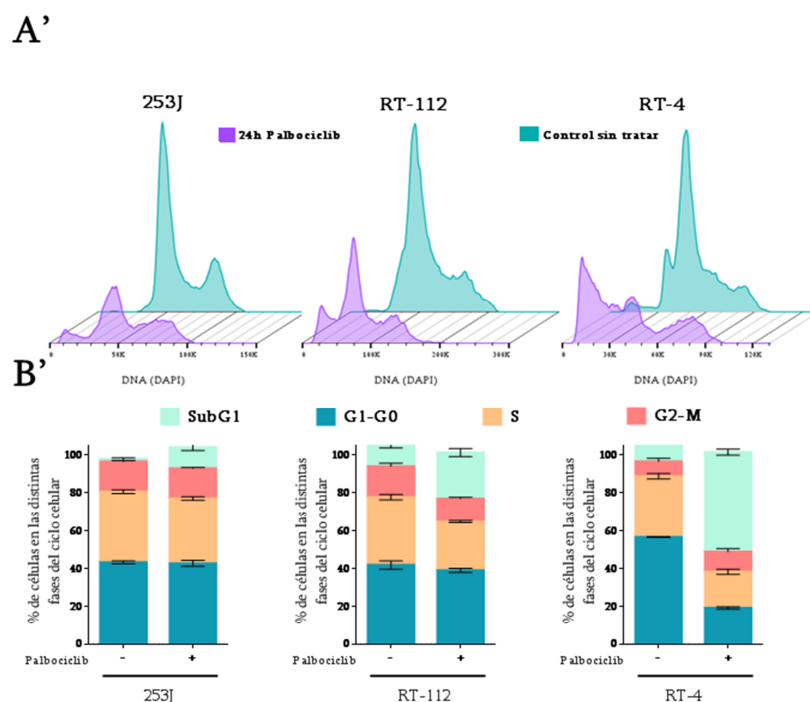


Figura 14. Análisis del ciclo celular por citometría de las distintas líneas celulares tras el tratamiento con palbociclib a IC50 durante 24 horas. Los nombres en rojo denotan las líneas celulares con mutación en *RB1* y los nombres en negro las líneas celulares sin mutación **A, A'**. Histogramas representativos del perfil de ciclo celular de cada una de las líneas celulares estudiadas con y sin tratamiento. **B, B'**. Representación gráfica de la media \pm SD del porcentaje de células de cada tipo celular en cada una de las fases del ciclo celular con (+) y sin tratamiento (-).

Pudimos observar que el tratamiento con palbociclib durante 24 horas fue suficiente para alterar el ciclo celular de las distintas líneas celulares (**Figura 14**). Este compuesto indujo una parada del ciclo celular en todas las líneas celulares, aunque esta parada tuvo lugar en diferentes fases del ciclo celular dependiendo del estatus del gen *RB1*. En los genotipos *RB1* wt, la parada de ciclo celular tuvo lugar en la fase G1 junto con una reducción del número de células en fase S, y produjo un aumento del porcentaje de células con un contenido de ADN subdiploide (sub G1), característico de células apoptóticas. Sin embargo, en las células *RB1* mut, el tratamiento con palbociclib produjo la parada de ciclo celular en la fase G2/M, con una inducción de apoptosis (sub G1), respecto del control sin tratamiento (**Figura 14**).

Resultados

Así, el análisis comparativo de las fases del ciclo celular entre las diferentes líneas celulares según su presencia de mutación en *RB1* mostró diferencias significativas en todos ellos, en especial una mayor inducción de apoptosis en las células *RB1* mut (Figura 15).

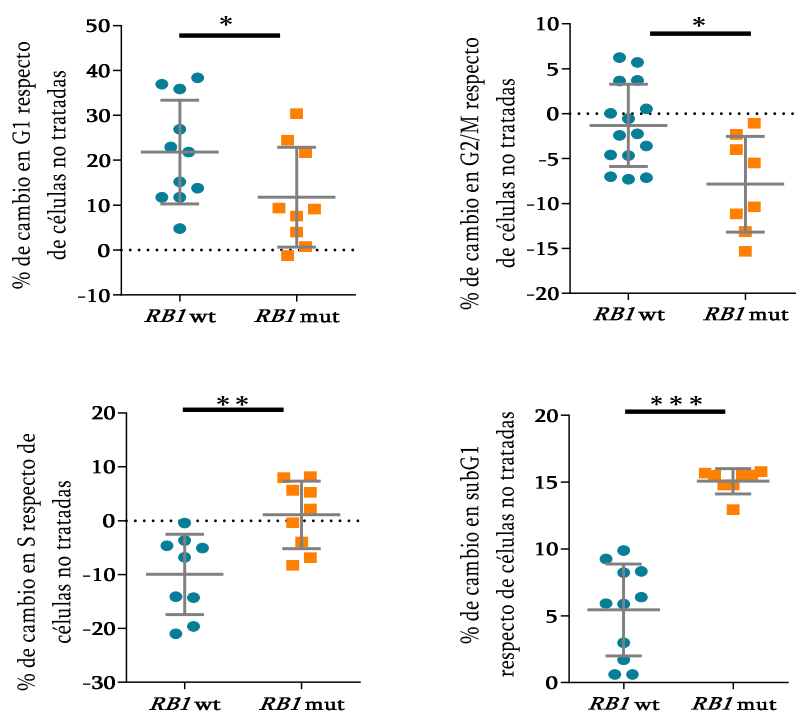


Figura 15. Resumen de los cambios en el ciclo celular como consecuencia del tratamiento con palbociclib. Los datos provienen de cada línea celular en relación con las células no tratadas, después se agrupan según el estado del gen *RB1* y se muestran con su SD. (*) $p \leq 0,05$; (**) $p \leq 0,01$; (***) $p \leq 0,005$

1.3. Estudio de las alteraciones producidas en la vía de señalización de CDK4/6 tras el empleo de palbociclib.

Tras comprobar que las células tratadas con palbociclib experimentan alteraciones en las fases del ciclo celular, nos propusimos analizar los posibles efectos del tratamiento con palbociclib en las distintas vías de señalización relacionadas con ciclo celular. Para ello, realizamos ensayos de western blot a partir de extractos proteicos de cinco líneas celulares tratadas durante seis horas con una dosis de 1 μ M de palbociclib.

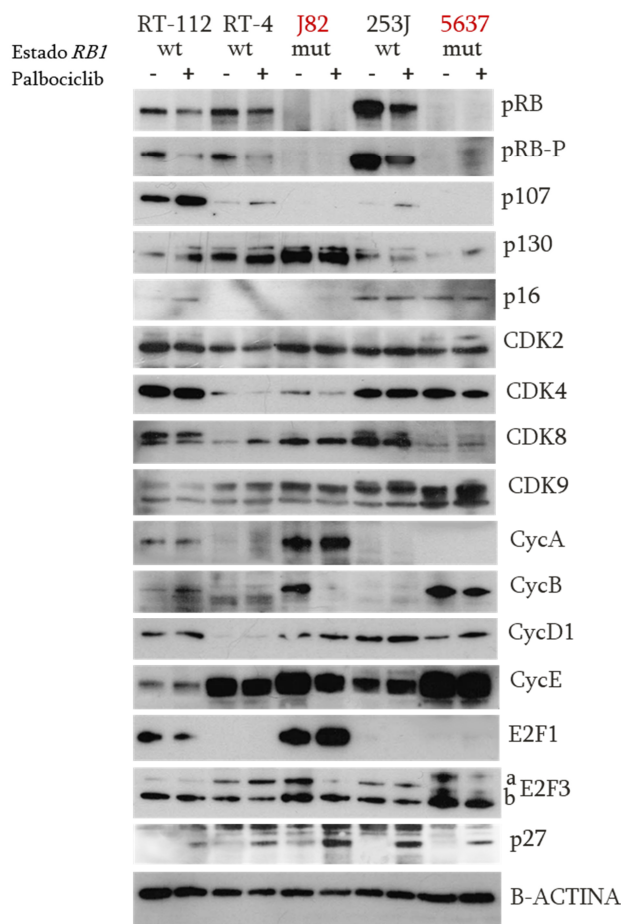


Figura 16. Estudio mediante western blot de las principales proteínas relacionadas con ciclo celular en las líneas celulares no tratadas (-) y tratadas con palbociclib (+). El estado del gen *RB1* se muestra para cada línea celular, los nombres en rojo denotan las líneas celulares con mutación en *RB1* y los nombres en negro las líneas celulares sin mutación. La β -actina se utilizó como control de carga.

Como se puede observar en la **Figura 16**, el tratamiento con palbociclib produjo una reducción de la fosforilación de pRB en los residuos Ser 807/811 en las células *RB1* wt, así como un aumento de la expresión de p107. Sin embargo, en las células *RB1* mut, además de observar la esperada ausencia de pRB, se encontró una disminución de la expresión de Ciclina B y E2F3a, lo cual correlaciona con los datos mostrados previamente en relación a la parada en la fase G2/M del ciclo celular en las células portadoras de mutaciones inactivantes de este gen. Por otro lado, no se observaron alteraciones en los niveles de expresión de CDK4, así como de otras quinasas dependientes de ciclinas como CDK2, CDK8 o CDK9, ni tampoco de las ciclinas A, D1 y E. Dado que las proteínas p16 y p27 son unas de las principales

Resultados

reguladoras de la cascada de señalización de CDKs-ciclinas, decidimos estudiar el posible efecto del tratamiento con palbociclib en sus niveles de expresión. De esta manera, observamos un aumento de la expresión de p27 en todas las líneas celulares independientemente de su estatus de *RBI*, mientras que la expresión de p16 no mostró cambios evidentes.

1.4. Papel antitumoral de palbociclib en tumores generados mediante xenoinjerto de líneas celulares de cáncer de vejiga en ratones inmunodeficientes.

Una vez caracterizado el efecto que ejerce palbociclib sobre las células de CU *in vitro*, decidimos investigar la capacidad antitumoral de este compuesto en una aproximación *in vivo*. Para ello, se realizaron inyecciones subcutáneas de las líneas celulares *RBI* wt (RT-112) y *RBI* mut (J82 y 5637) en el flanco de ratones inmunodeficientes *Foxn1^{nu/nu}* (xenoinjertos).

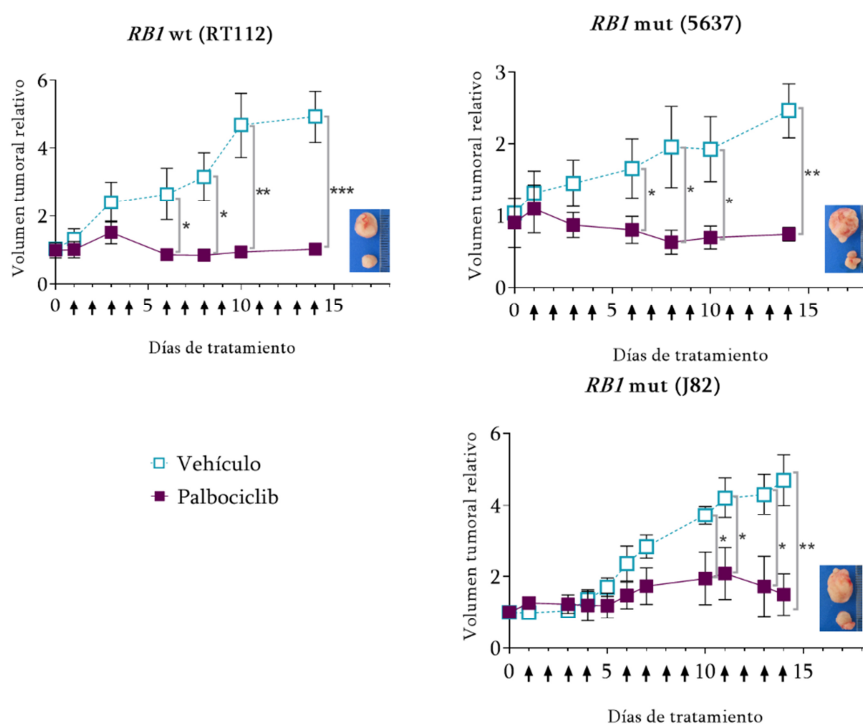
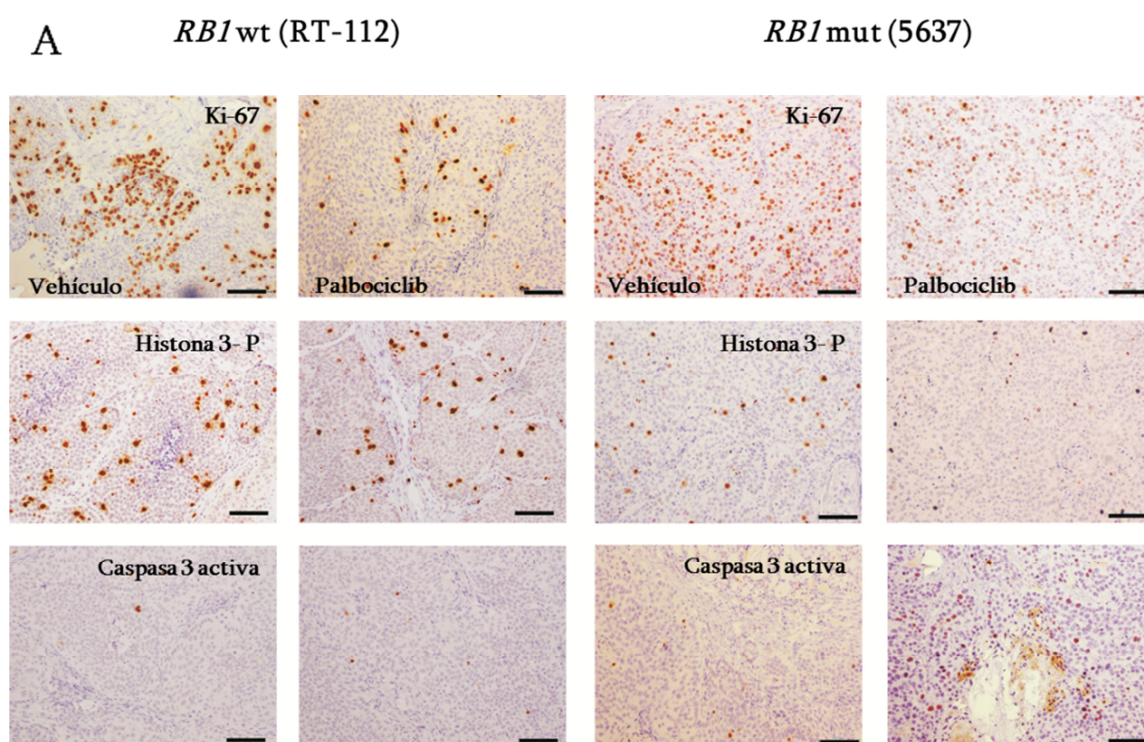


Figura 17. Efecto de palbociclib en el crecimiento tumoral de xenoinjertos derivados de RT-112, 5637 y J82. Las flechas indican los puntos temporales de la administración de palbociclib. Las imágenes adyacentes muestran ejemplos de tumores no tratados (arriba) y tratados (abajo) al final del experimento para cada línea celular. Los datos están representados como la media \pm la desviación estándar para cada uno de los experimentos realizados con las diferentes líneas celulares (n=20, por cada experimento). Los asteriscos muestran las diferencias significativas (*) $p \leq 0,05$; (**) $p \leq 0,01$; (***) $p \leq 0,005$.

De manera análoga a lo observado anteriormente en los experimentos *in vitro*, en los xenoinjertos de las líneas tumorales en animales inmunodeficientes encontramos que el tratamiento con palbociclib inhibe el crecimiento tumoral y que su actividad es independiente del estatus mutacional del gen *RB1* (**Figura 17**). Con el objetivo de conocer los procesos que dan lugar a esta inhibición del crecimiento tumoral, los tumores obtenidos (tratados con el vehículo y tratados con palbociclib) se caracterizaron mediante la realización de tinciones inmunohistoquímicas, evaluando los niveles de expresión de algunas proteínas relacionadas con proliferación celular (como Ki-67), el proceso mitótico (como la histona-3 fosforilada en el residuo Ser10) y de procesos apoptóticos (como la caspasa-3 activa en el residuo Asp175) (**Figura 18**).



Resultados

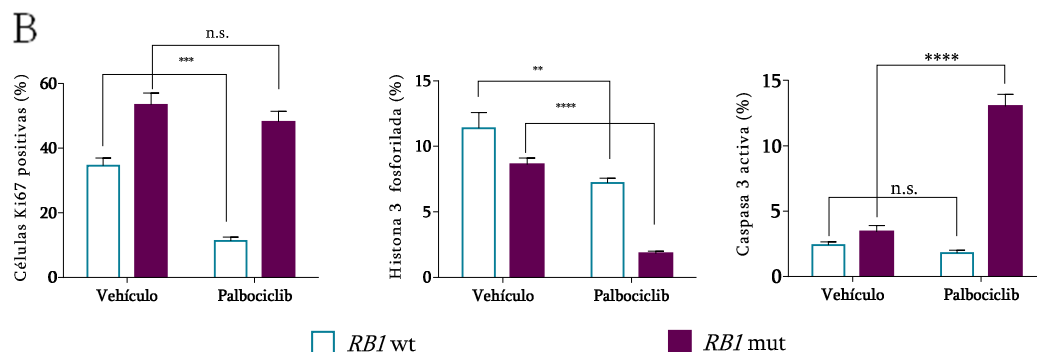


Figura 18. Expresión de Ki-67, histona 3 fosforilada y caspasa-3 activa en tumores derivados de xenoinjertos tratados con palbociclib. A-B) Ejemplos representativos de tinciones inmunohistoquímicas de tumores tratados con palbociclib y control (vehículo) de (A) RT-112 (*RB1* wt) y (B) 5637 (*RB1* mut) específicas para Ki-67, caspasa-3 activa e histona 3 fosforilada. Barras = 150 μ m. C) Gráficos de barras mostrando el análisis cuantitativo de cada una de las tinciones. Los datos provienen de 5 tumores diferentes para cada línea celular y condición (tres secciones independientes) y se muestran como media \pm SEM. n.s (no significativo); (**) $p \leq 0,01$; (***) $p \leq 0,0005$ (****) $p \leq 0,0001$; según lo determinado por la prueba de suma de rangos Wilcoxon.

En la valoración inmunohistoquímica podemos observar una reducción de Ki-67 en los tumores derivados de células *RB1* wt, en concordancia con los resultados obtenidos en el ciclo celular *in vitro* (**Figura 18**). Sin embargo, en los tumores derivados de las células *RB1* mut la disminución de la mitosis (evaluada mediante la tinción de la histona 3 fosforilada) fue más significativa, junto con la inducción de la apoptosis (caspasa-3 activa). Además, como cabía esperar, en los tumores derivados de las células *RB1* wt se obtuvo una inhibición significativa de la fosforilación de la proteína RB en los residuos Ser 807/811 (pRB) (**Figura 19**).

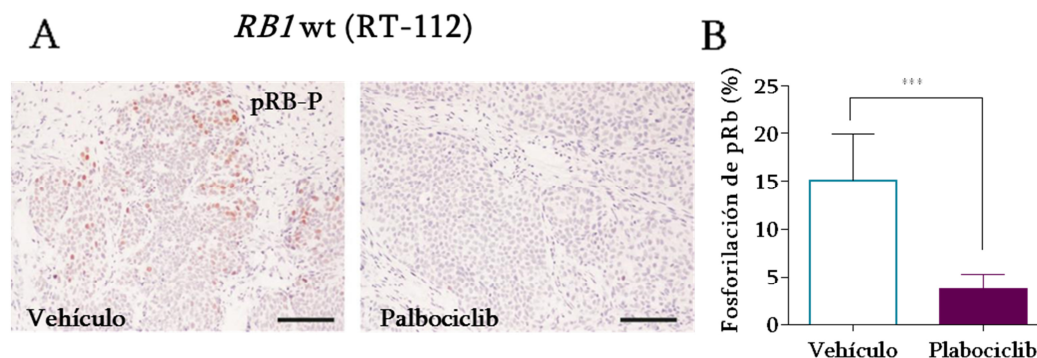


Figura 19. Inhibición de la fosforilación de pRB en los tumores derivados de las células *RB1* wt tratados con palbociclib (A). Ejemplo representativo de tinciones inmunohistoquímicas de pRB fosforilada en los tumores tratados con palbociclib y control (vehículo) derivados de las células RT-112 (*RB1* wt) Barras = 150 μ m. **(B)** Análisis cuantitativo de la tinción. Los datos provienen de 5 tumores diferentes para cada línea celular y condición (tres secciones independientes) y se muestran como media \pm SEM. (***) $p \leq 0,0005$ según lo determinado por la prueba de suma de rangos Wilcoxon.

Estos resultados indican que el inhibidor de CDK4/6 es activo tanto *in vitro* como *in vivo* en células de CU, independientemente de la presencia de mutación en el gen *RB1*, aunque la inhibición de CDK4/6 produzca diferentes efectos en el ciclo celular de las células *RB1* wt y de las células mutantes.

2. FOXM1 actúa como diana de la inhibición de CDK4 /6.

2.1. Análisis transcriptómico de las líneas celulares de cáncer de vejiga tratadas con palbociclib.

Una vez comprobada la efectividad del inhibidor de CDK4/6 tanto *in vitro* como *in vivo*, decidimos estudiar en mayor profundidad el mecanismo de acción del fármaco. Para ello, se realizaron estudios de expresión génica empleando microarrays. En estos estudios se llevó a cabo la comparación de los niveles de expresión génica de las líneas celulares de cáncer de vejiga sin tratar y tratadas durante 24 horas a una dosis de IC₅₀ de palbociclib (**Figura 20A**). Realizamos un análisis entre los genes inducidos y reprimidos por el tratamiento con Palbociclib en las tres líneas celulares (J82, 5637 y RT-112) sin encontrar coincidencias significativas (**Figura 20B**). Además, el análisis de ontología génica de las vías

Resultados

funcionales involucradas en los genes diferencialmente expresados en las distintas líneas celulares tratadas con palbociclib (tanto *RB1* wt como mutantes), mostró que las alteraciones son en un número reducido de vías funcionales (**Figura 21**).

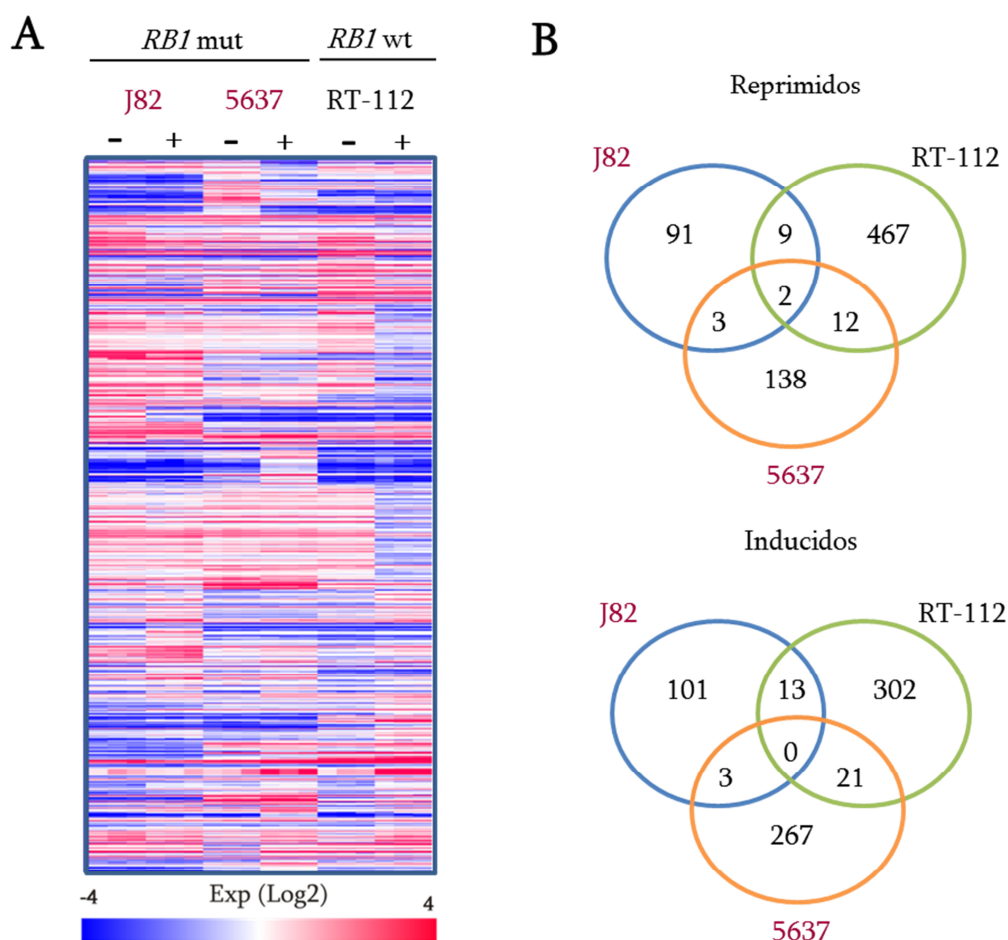


Figura 20. Comparación del transcriptoma de líneas celulares tratadas con palbociclib y sin tratar (A). “Heatmap” que muestra los cambios globales del transcriptoma en las células J82, 5637 y RT-112 como consecuencia del tratamiento con palbociclib (+) (dosis de IC50 durante 24 horas) y sin tratamiento (-). **(B)** Diagramas de Venn que muestran la superposición de transcritos reprimidos (arriba) e inducidos (parte inferior) en las diferentes líneas celulares como consecuencia del tratamiento con palbociclib.

Para identificar aquellos factores de transcripción que están más representados como elementos reguladores de los genes que se desregulan como consecuencia del tratamiento con palbociclib, se empleó un análisis bioinformático utilizando la herramienta de análisis de enriquecimiento de datos de inmunoprecipitación de cromatina (ChEA; del inglés *ChIP Enrichment Analysis*). Esta herramienta informática engloba información de múltiples publicaciones y datos experimentales que reportan la unión de ciertos factores de transcripción a zonas reguladoras de determinados genes datadas experimentalmente mediante ChIP-PCR, ChIP-Seq o ChIPMassSpec. Estos análisis también revelaron disparidades entre los genes reprimidos e inducidos en las células *RB1* wt vs. *RB1* mut (**Figura 22**), de acuerdo con las diferencias existentes entre los patrones de genes desregulados en cada caso. Sin embargo, una fracción significativa de los transcritos reprimidos en ambos tipos celulares presentan sitios de unión a FOXM1 y, por tanto, son posiblemente regulados de forma positiva por este factor de transcripción, mientras que genes relacionados con otros factores de transcripción habitualmente relacionados con la funcionalidad de *RB1* e implicados en la regulación del ciclo celular, como los pertenecientes a la familia E2F, parecen afectar principalmente a los genes reprimidos en las células *RB1* wt (**Figura 22**).

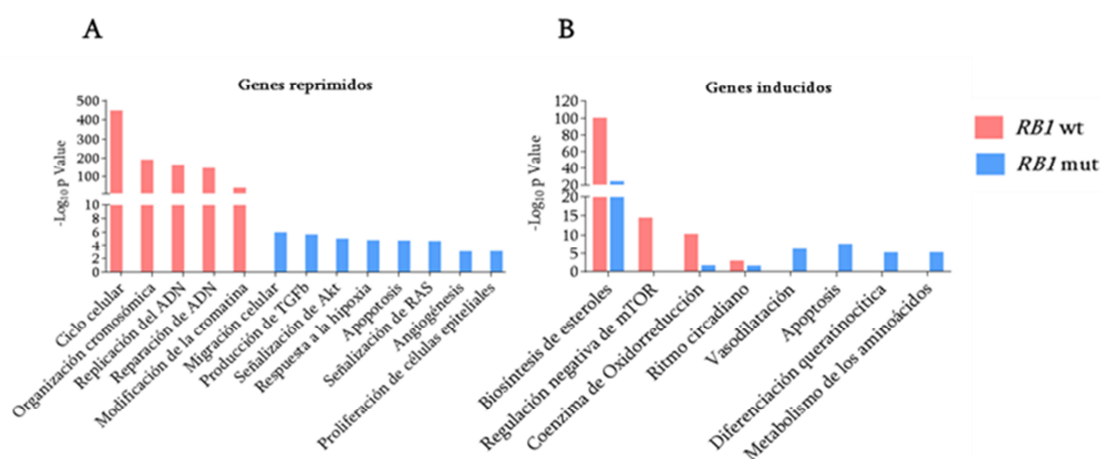


Figura 21. Procesos biológicos relacionados con genes desregulados por el tratamiento con palbociclib. Procesos en los que están involucrados los genes reprimidos (A) e inducidos (B) en células *RB1* wt (rojo) y *RB1* mut (azul) tratadas con palbociclib.

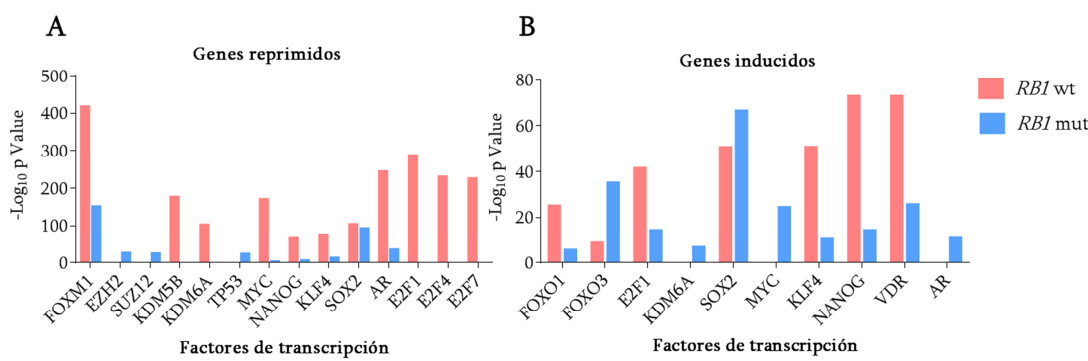


Figura 22. Análisis de los factores de transcripción que median la regulación génica de las células *RB1* mut y *RB1* wt tratadas con palbociclib mediante enriquecimiento de genes a partir de los microarrays de expresión. Se muestran los factores de transcripción más relevantes de los genes reprimidos (A) e inducidos (B) en las células *RB1* wt y *RB1* mut tratadas con palbociclib.

2.2. Identificación de FOXM1 como mediador de la respuesta a palbociclib.

A partir de los resultados observados en el apartado anterior, decidimos estudiar el posible papel de FOXM1 como molécula mediadora del efecto de palbociclib como agente antitumoral. CDK4/6 puede activar FOXM1 mediante la fosforilación de varios residuos, incluido Thr600⁶⁷. Además, se ha visto también que CDK1 es capaz de fosforilar la proteína EZH2 lo cual provoca la inhibición de la actividad de metiltransferasa de EZH2, y produce un retraso en la transición G2/M del ciclo celular. Y por último, se ha demostrado que el tratamiento con palbociclib aumenta la activación de la señalización de las vías AKT/ mTOR y MAPK. Por todo ello, nos propusimos evaluar el efecto del tratamiento sobre la fosforilación de FOXM1, EZH2 (Thr487), AKT (Ser473) y ERK (Thr202/Tyr204) (**Figura 23**). Tras tratar cinco líneas celulares de cáncer de vejiga con palbociclib durante 24 horas a su correspondiente IC50, observamos una reducción significativa del estado fosforilado de FOXM1 en el residuo Thr600 en todas las células tratadas, y una ligera disminución de EZH2 (Thr487), pero sin cambios significativos en los niveles de AKT (Ser473), ERK1/2 (Thr202/Tyr204), o niveles totales de FOXM1.

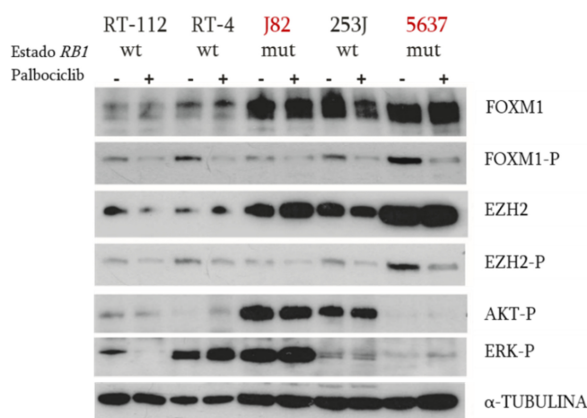


Figura 23. Estudio de distintas quinasas y forma fosforilada de FOXM1 en las células tratadas y no tratadas con palbociclib (IC50 durante 24 horas). Los nombres en rojo denotan las líneas celulares con mutación en *RB1* y los nombres en negro las líneas celulares sin mutación. La α -tubulina se utilizó como control de carga.

Para validar *in vivo* que FOXM1 es una diana indirecta de la inhibición de CDK4/6, analizamos los niveles de fosforilación de FOXM1 en el residuo Thr600 (FOXM1-P) en muestras procedentes de los xenoinjertos previamente obtenidos a partir de células *RB1* wt y de *RB1* mutantes. En ambos casos, se observó una inhibición significativa de esta fosforilación como consecuencia del tratamiento con palbociclib (Figura 24).

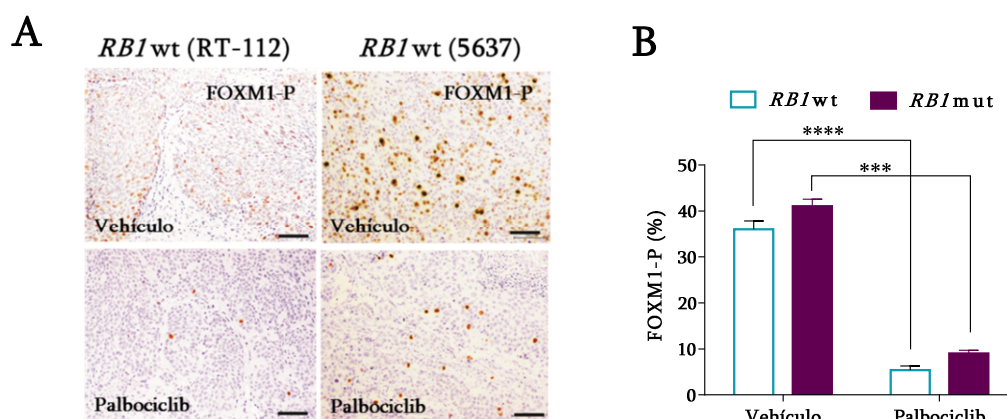


Figura 24. Evaluación de la fosforilación de FOXM1 tras el tratamiento con palbociclib en un modelo *in vivo*. (A) Ejemplos representativos de tinciones inmunohistoquímicas de FOXM1-P en los tumores generados a partir de las células RT-112 (*RB1* wt) y 5637 (*RB1* mut) tratados con palbociclib y control (vehículo). Barras = 150 μ m. (B) Análisis cuantitativos de la tinción. Los datos provienen de 5 tumores diferentes para cada línea celular y condición (tres secciones independientes) y se muestran como media \pm SEM. (****) $p \leq 0,0001$; (***) $p \leq 0,0005$ según lo determinado por el test de Mann-Whitney.

Resultados

Estos resultados fueron confirmados mediante silenciamiento de la proteína CDK4, empleando un shARN específico para esta molécula, tanto en una línea *RB1* wt (RT-112) como en una línea *RB1* mut (5637). En ambos tipos celulares se observó una reducción de FOXM1-P tras el silenciamiento de CDK4 (**Figura 25A**), acompañado de una disminución de los niveles totales de FOXM1 en el caso de las células *RB1* mutantes. Estos efectos no se observaron en el caso del silenciamiento de CDK2, el cual produce, por ejemplo, un aumento de FOXM1-P en células *RB1* wt, y el incremento de los niveles totales de FOXM1 en ambos tipos celulares (**Figura 25B**). Estos resultados refuerzan la observación anterior de que la inhibición de CDK4, pero no de CDK2, disminuye los niveles la fosforilación de FOXM1 en el residuo Thr600.

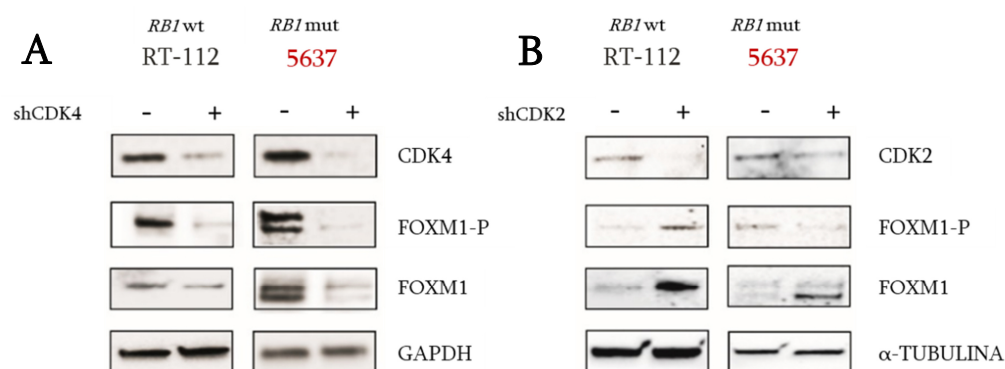


Figura 25. Efecto del silenciamiento de CDK4 y CDK2 en la fosforilación de FOXM1 en líneas celulares de cáncer de vejiga. En el panel izquierdo se muestran los resultados del silenciamiento de CDK4 (A) o CDK2 (B) en las líneas celulares RT-112 y 5637. El control (-) utilizado fue un shARN inespecífico. Se utilizaron como control de carga GAPDH y α -Tubulina.

Para estudiar la interacción entre las vías de señalización de *RB1* y *FOXM1* se llevaron a cabo experimentos de silenciamiento de pRB en una línea celular *RB1* wt (RT-112) (**Figura 26**). De esta manera, pudimos observar a nivel proteico que la disminución de pRB produjo un aumento de la expresión de FOXM1 (tanto de los niveles totales como de su isoforma fosforilada en el residuo Thr600) acompañado de un aumento de CDK4, ciclina D3 y una disminución de ciclina D1. Todo ello en conjunto sugiere que la activación de FOXM1 se ve incrementada en ausencia de pRB y puede depender de los complejos CDK4/6/cycD3 en las líneas celulares

estudiadas (**Figura 26A**). Sin embargo, la sensibilidad a palbociclib de esta línea celular no se ve afectada cuando silenciamos pRB (**Figura 26B**), apoyando de nuevo la existencia de un mecanismo independiente de *RB1* por el cual palbociclib induce la inhibición de la proliferación de las líneas de cáncer de vejiga.

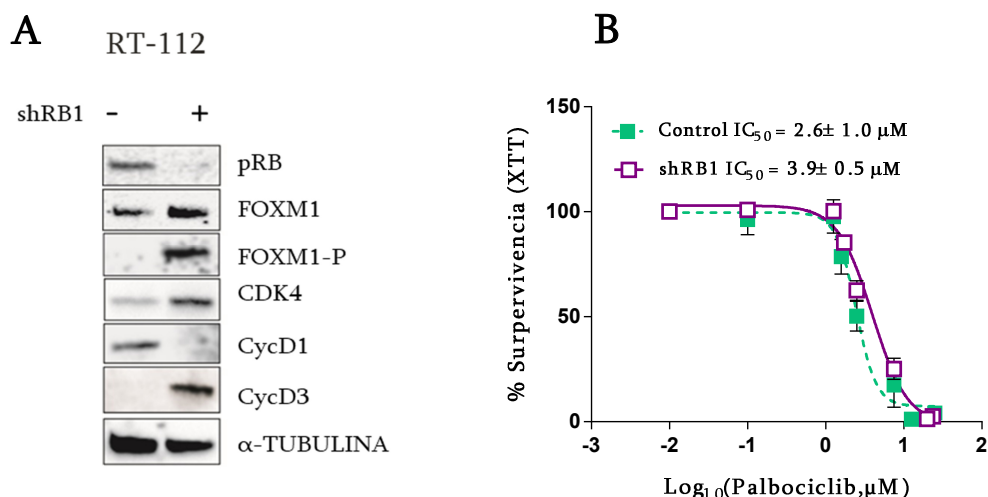


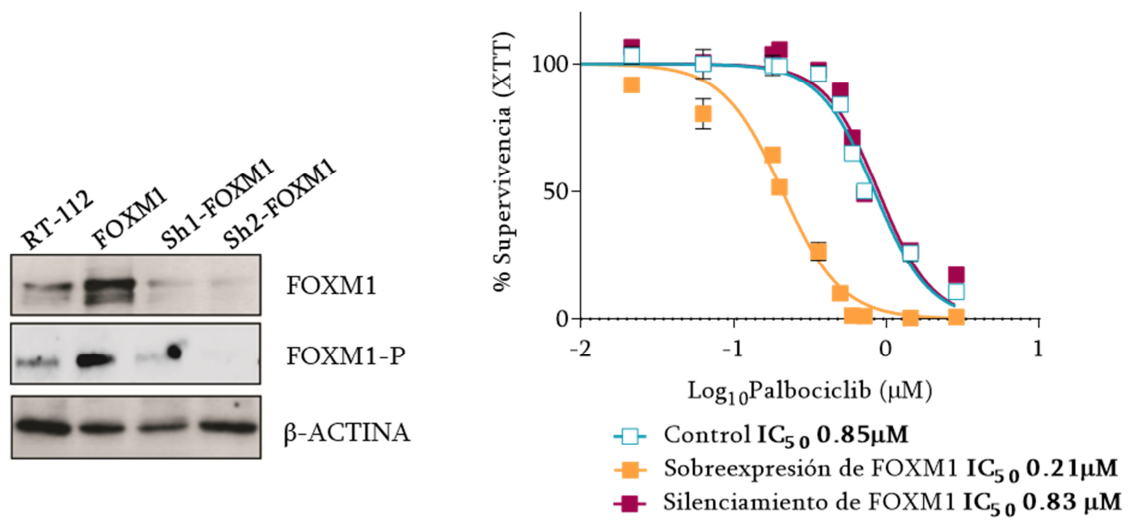
Figura 26. Interacción entre la vía pRB y FOXM1 en la línea celular RT-112 (*RB1* wt). (A) Modificación de la expresión de FOXM1, CDK4 y algunas ciclinas tras el silenciamiento de pRB en una línea celular *RB1* wt (B). Sensibilidad a palbociclib tras el silenciamiento de pRB mediante XTT. Los datos provienen de 5 experimentos independientes y se muestran como media ± SEM.

2.3. Estudio de la sensibilidad a palbociclib dependiente de FOXM1.

Para analizar si la sensibilidad al inhibidor de CDK4/6 es o no dependiente de la expresión de FOXM1, realizamos experimentos de aumento de expresión y silenciamiento de FOXM1 en las líneas celulares RT-112 y 5637 (empleando un plásmido que permite la expresión exógena de la proteína y dos shARNs específicamente diseñados para ello, respectivamente). En estos experimentos encontramos que el aumento de expresión de FOXM1, acompañada de una mayor fosforilación de este, confiere mayor sensibilidad a palbociclib, mientras que la reducción de FOXM1 promueve una resistencia en las células *RB1* mutantes (**Figura 27**). Estos resultados nos permiten considerar que FOXM1 es un posible marcador subrogado de la sensibilidad a palbociclib, en particular en ausencia de *RB1* funcional.

A

RT-112



B

5637

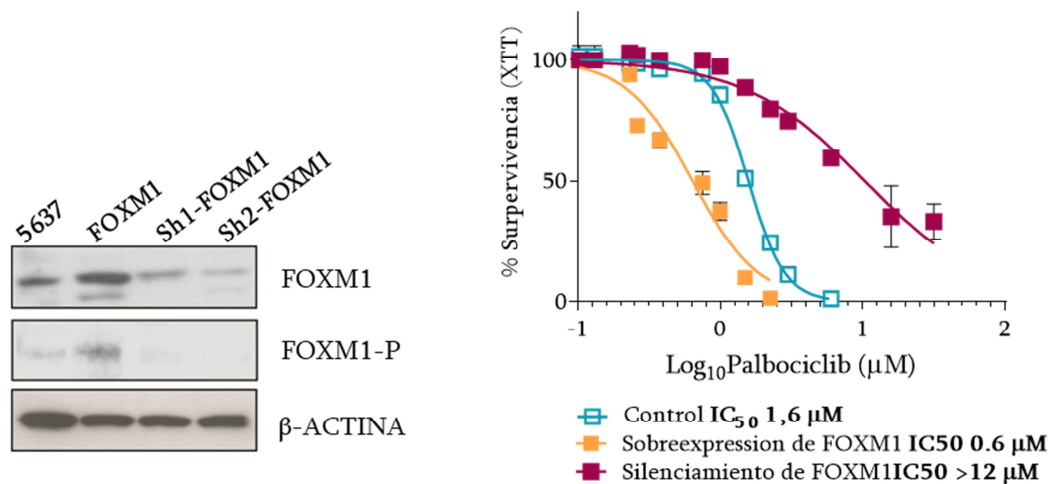


Figura 27. Efectos del aumento de expresión o silenciamiento de FOXM1 en la sensibilidad a palbociclib en las líneas celulares RT-112 (*RB1* wt) (A) y 5637 (*RB1* mut) (B). En el panel izquierdo se muestran los efectos a nivel de proteína de FOXM1, y en el panel derecho se muestra la sensibilidad a palbociclib mediante XTT. Los datos provienen de 5 experimentos independientes y se muestran como media \pm SEM.

Para determinar si la disminución de FOXM1 puede o no afectar al crecimiento tumoral se llevaron a cabo experimentos de xenoinjertos con las líneas celulares RT112 y 5637. Se inocularon ambas líneas celulares parentales y con FOXM1 silenciado (empleando para ello el mejor de los dos silenciamientos evaluados *in vitro*) en ratones inmunodeficientes. Como se puede observar en la **Figura 28**, confirmamos que hay una inhibición del crecimiento tumoral como consecuencia de la reducción del nivel expresión de FOXM1 en ambas líneas celulares.

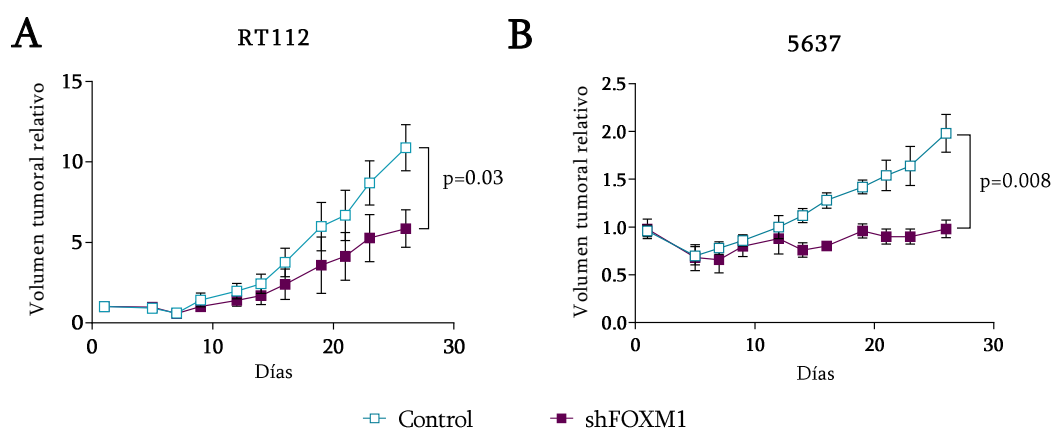


Figura 28. Curvas de crecimiento tumoral de las líneas celulares RT-112 (A) y 5637 (B) comparando las células parentales y aquellas con silenciamiento de FOXM1 en xenoinjertos de ratones desnudos. Los datos provienen de 5 ratones independientes en cada grupo y se muestran como media relativa de crecimiento \pm SEM. Los valores de p-valor se obtuvieron mediante la prueba de comparación múltiple ANOVA y Bonferroni.

En su conjunto, estos resultados muestran que FOXM1 es una diana de la inhibición de CDK4 en líneas celulares de cáncer de vejiga, independientemente de la presencia de mutación en el gen *RBI*, remarcando su importante papel en la proliferación, el cual se vuelve esencial en ausencia de la proteína pRB.

3. Importancia de FOXM1 en el cáncer de vejiga.

3.1. Los niveles de FOXM1 predicen la recurrencia en el cáncer de vejiga.

Una vez demostrado el papel importante de FOXM1 en la señalización de CDK4, decidimos estudiar su posible relevancia en el CU humano, empleando para ello muestras de pacientes de CU obtenidas de un estudio prospectivo (Ver **Anexo I**). Se purificó ARN total de 38 muestras seleccionadas (28 muestras tumorales y 10 muestras de tejido sano) y se realizaron experimentos de hibridación y cuantificación de la expresión génica por microarrays. A partir de los datos de expresión génica obtenidos, se llevó a cabo un agrupamiento jerárquico supervisado, es decir, un agrupamiento de los genes diferencialmente expresados que agrupan las muestras según sean tejido normal, tumores primarios con recurrencia o sin recurrencia (**Figura 29A**). Una vez llevado a cabo este análisis, observamos que los genes que muestran una inducción de su expresión en el grupo de tumores primarios que posteriormente mostraron recurrencia, presentan un enriquecimiento significativo de sitios de unión a FOXM1, además de E2F y MYC (entre otros factores) (**Figura 29B**). Además, estos mismos genes mostraron una superposición significativa con los genes que se encuentran regulados a la baja tras el tratamiento con palbociclib en diversas líneas celulares (**Figura 29C**). Sorprendentemente, cuando se hizo una agrupación no supervisada según la expresión de los genes que presentan unión a FOXM1^{97,127}, encontramos una clara discriminación entre las muestras normales y tumorales, así como una separación entre los tumores de pacientes que posteriormente presentaron o no recurrencia (**Figura 29D**).

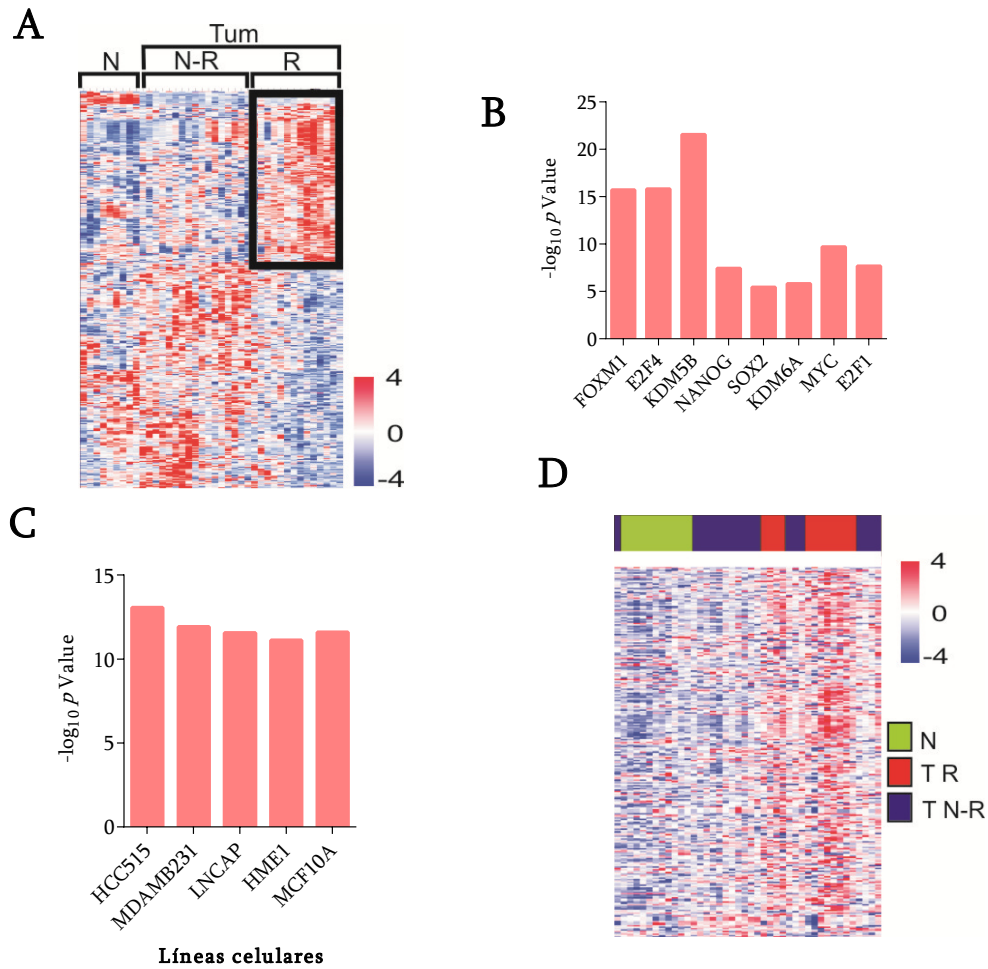


Figura 29. Caracterización transcriptómica de la serie prospectiva de pacientes con CU. (A) “Heatmap” que muestra la clasificación supervisada de genes que discriminan muestras de tejido normal (N) y muestras de tejido tumoral procedente de tumores primarios (Tum) que luego mostraron recurrencia (R) o no (N-R)¹¹⁸. (B) Análisis “*Transcription Factor Binding Site Enrichment*” de genes inducidos en los tumores primarios con recurrencia. (C) Superposición entre genes inducidos en los tumores primarios con recurrencia y genes reprimidos en líneas celulares con el tratamiento de palbociclib. (D) “Heatmap” que muestra la clasificación no supervisada de la serie de pacientes según el nivel de expresión de genes identificados previamente como ligados y regulados por FOXM1¹²⁷.

N corresponde a muestras de vejiga normal; T R corresponde a muestras de tumor primario con recurrencia durante el seguimiento; T N-R corresponde a muestras de tumor primario que no mostró recurrencia durante el seguimiento.

Resultados

Los análisis de expresión de *FOXMI* mediante RT-qPCR en esta serie de pacientes confirmaron el aumento de expresión de este gen en las muestras tumorales frente al tejido normal (**Figura 30A**). Además, dentro de las muestras de tipo tumoral, se vio que la expresión de *FOXMI* está aumentada en aquellas que presentaban un alto grado (**Figura 30B**) y en muestras procedentes de pacientes con recurrencia (**Figura 30C**). Por otro lado, también se observó un aumento en los niveles de expresión de *FOXMI* en aquellos tumores que mostraron progresión del tumor en la recurrencia (**Figura 30D**). Sin embargo, no encontramos diferencias cuando se compararon los niveles de expresión de los tumores en los estadios Ta-T1 (**Figura 30E**).

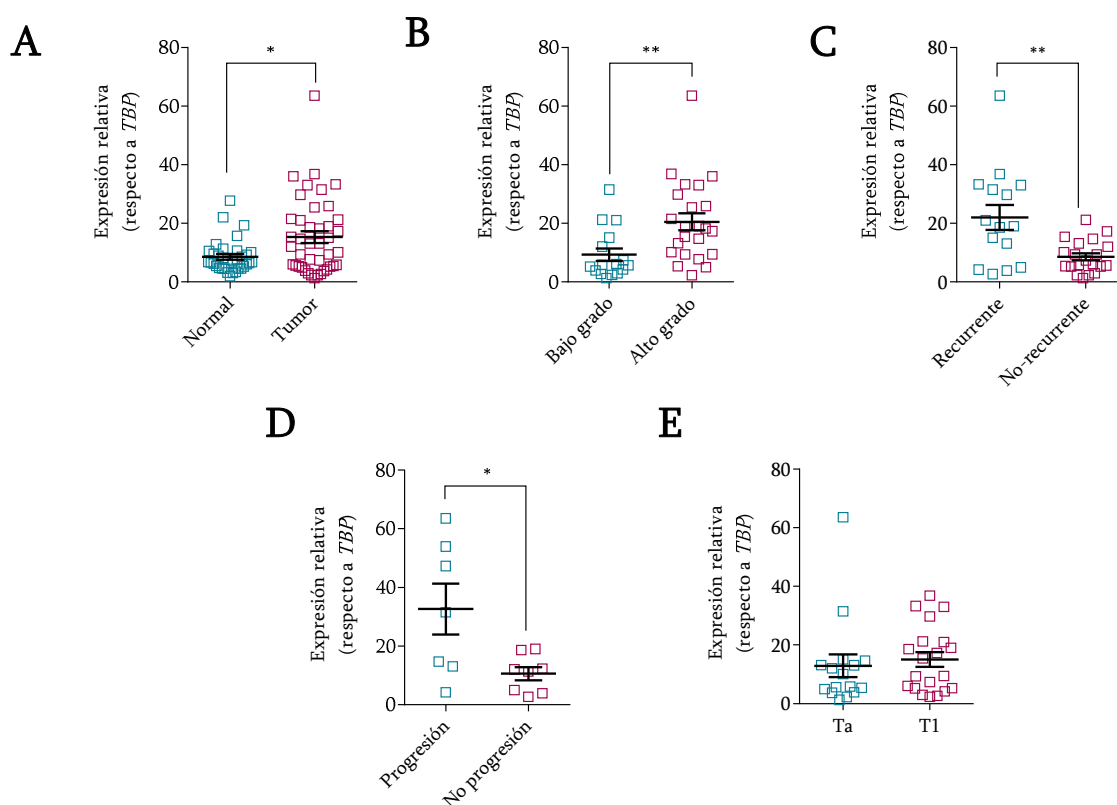


Figura 30. Expresión diferencial de *FOXMI* en muestras de pacientes CUNMI. Análisis de RT-qPCR que muestran los niveles de expresión de *FOXMI* en las muestras de tejido normal (n= 34) y de tumores primarios (n= 42) (**A**), tumores de grado bajo histológico de malignidad (n=16) versus tumores de alto (n=23) (**B**), tumores recurrentes (n=15) versus tumores no recurrentes (n=20) (**C**), tumores que no muestran progresión frente a tumores que progresan tras la recurrencia (**D**) y tumores de estadios Ta (n=16) versus T1(n=20) (**E**) en la serie de pacientes CUNMI. (*) $p \leq 0,05$; (**) $p \leq 0,01$ según lo determinado por el test de Mann-Whitney.

De forma adicional, se llevaron a cabo tinciones inmunohistoquímicas de los tumores para evaluar el nivel de activación de FOXM1 en los mismos. De esta manera observamos que el nivel de fosforilación de FOXM1 en el residuo Thr-600 era capaz de discriminar los tumores que posteriormente presentaron recurrencia de aquellos que no recurrieron (**Figura 31AB**).

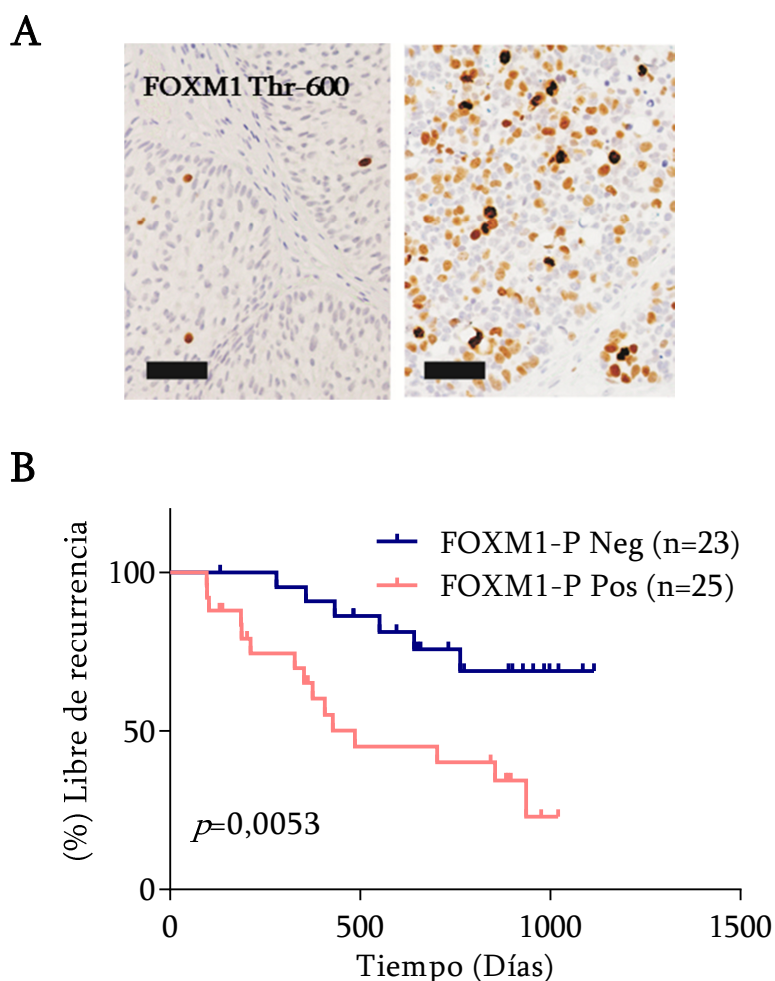


Figura 31. Niveles de fosforilación en Thr600 de FOXM1 discriminan el tiempo de recurrencia en muestra de CUNMI. (A) Imágenes representativas de inmunohistoquímicas de la expresión de FOXM1 fosforilado en Thr600 en muestras de CUNMI que muestran un ejemplo de tinción negativa (izquierda) y un ejemplo de tinción positiva (derecha). Barra de escala, 150 μ m. (B) Gráfico de Kaplan-Meier que muestra la recurrencia en función de la clasificación de la expresión de FOXM1-P en muestras humanas de CUNMI. El valor de p fue determinado mediante la prueba de log-rank.

Resultados

Asimismo, utilizando la base de datos TCGA (del inglés, *The Cáncer Genome Atlas*) que contiene una serie compuesta casi exclusivamente por pacientes con CUMI, encontramos que los niveles transcripcionales de *FOXM1* se asocian significativamente a una menor tasa de supervivencia por enfermedad específica (Figura 32).

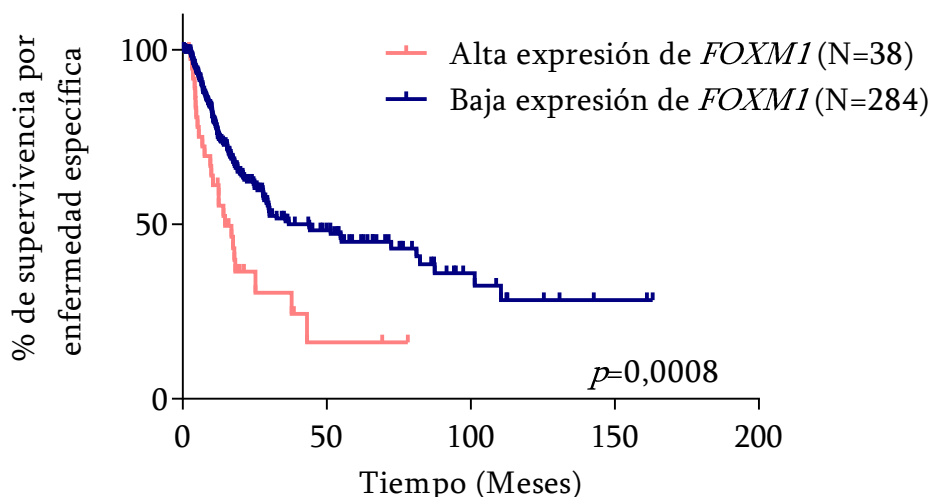


Figura 32. Los niveles transcripcionales de FOXM1 discriminan la tasa de supervivencia utilizando datos de TCGA. Gráfico de Kaplan-Meier que muestra la supervivencia por enfermedad específica de pacientes con CUMI (de la base de datos TCGA) según la expresión alta o baja del gen FOXM1. El valor de p fue determinado por la prueba estadística de log-rank.

Finalmente, utilizando los genes identificados previamente como dianas de FOXM1 mediante ChIP-Seq^{97,127}, se analizó mediante la herramienta GSEA si esta lista de genes es capaz de diferenciar los diferentes subtipos de CU del TCGA. En este análisis se vio que los grupos III y IV del TCGA mostraron un enriquecimiento positivo de estos genes, mientras que el grupo II mostró un enriquecimiento negativo (Figura 33A). Estos resultados fueron reforzados mediante un análisis supervisado de los subgrupos del TCGA mediante la expresión de esta misma lista de genes, mostrando un aumento de su expresión en los subgrupos III y IV, y una disminución de expresión en el subgrupo II (Figura 33B).

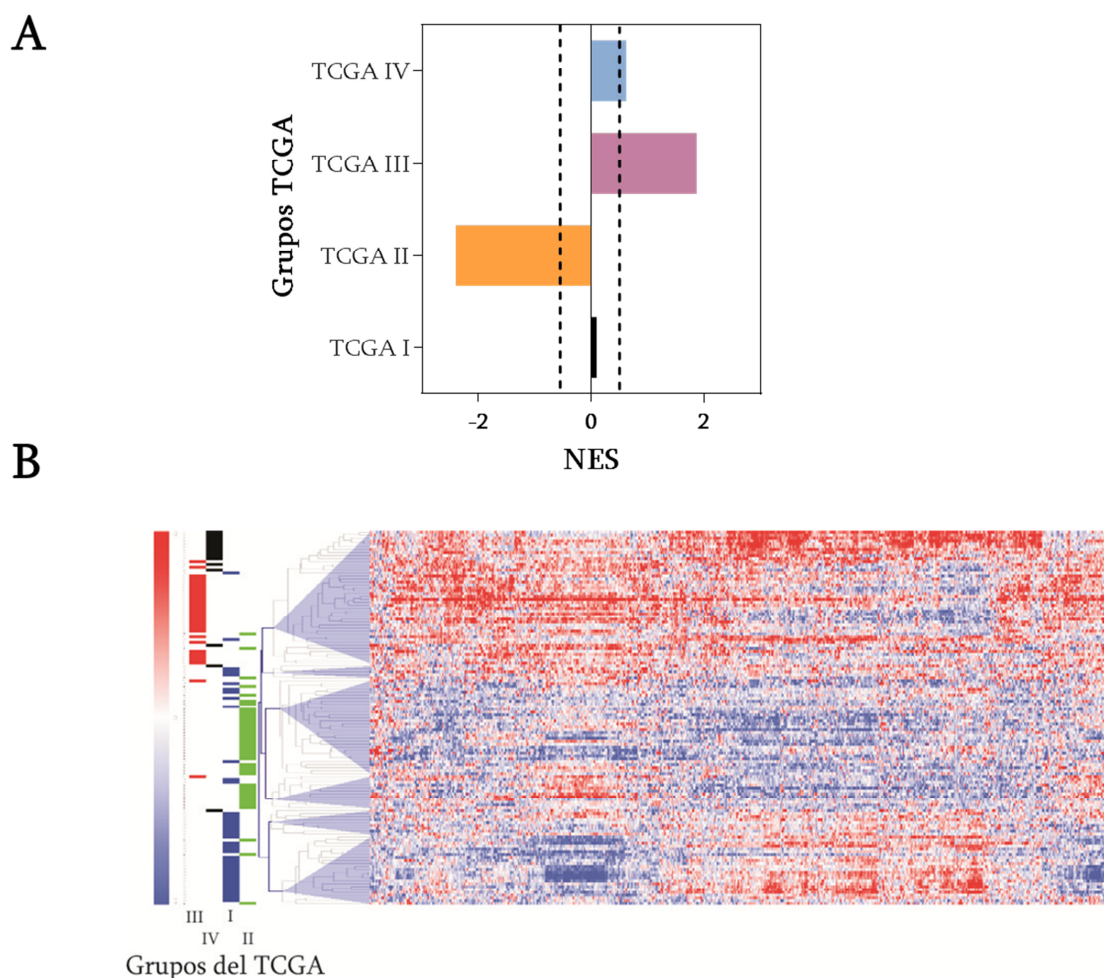


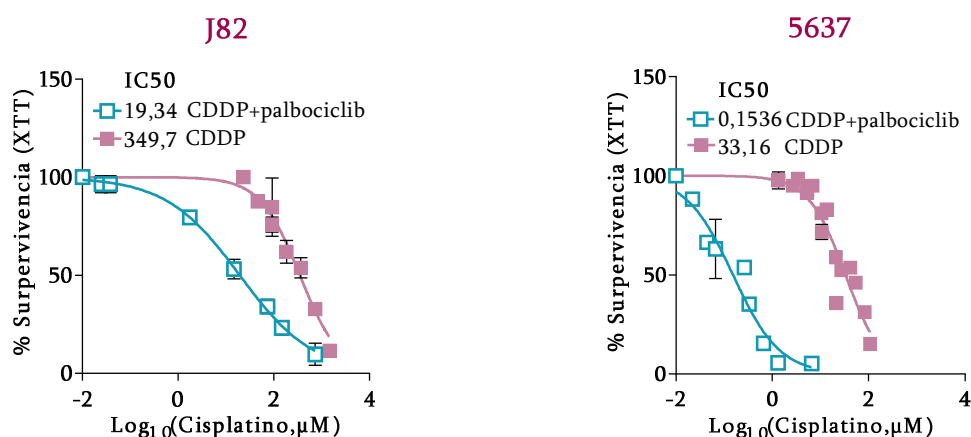
Figura 33. Los genes identificados previamente como dianas de FOXM1 mediante ChIP-Seq discriminan los grupos del TCGA. (A) Normalized enrichment score (NES) en los diferentes subtipos de cáncer de vejiga TCGA diferenciados por los genes identificados como dianas de FOXM1. (B) “Heatmap” mostrando la clasificación supervisada de genes unidos por FOXM1 a lo largo de los diferentes subtipos de cáncer de vejiga TCGA.

Los resultados comentados anteriormente reafirman que FOXM1 tiene un papel importante en el desarrollo y la progresión del CU. De forma relevante, los datos referentes a la fosforilación de FOXM1 en la Thr600 en las muestras de CUNMI, podrían indicar que dicha forma fosforilada de FOXM1 podría ser un biomarcador predictivo de recurrencia temprana y apoyarían la utilización de inhibidores de CDK4/6 en los pacientes con CU.

4. Utilización de palbociclib junto con el quimioterápico cisplatino.

4.1. Efecto de la terapia combinada de palbociclib con cisplatino sobre la supervivencia celular en líneas celulares de cáncer de vejiga.

El tratamiento estándar en primera línea para el CUMI es la quimioterapia con cisplatino (CDDP) combinado con gemcitabina o MVAC, siendo preferida la primera opción por tener un mejor perfil de seguridad. Sin embargo, más del 50% de los pacientes no cumple con los criterios de elección para esta terapia debido a que presentan comorbilidades que impiden su empleo a las dosis establecidas por riesgos de toxicidades extremas. Motivados por hallazgos recientes que demuestran que el aumento de expresión o actividad de FOXM1 confiere resistencia a platino^{128,129}, decidimos comprobar si la inhibición de CDK4/6 puede o no afectar a la respuesta a cisplatino. Para ello, realizamos curvas de sensibilidad a cisplatino y a la combinación de cisplatino con palbociclib en las líneas celulares de cáncer de vejiga (Figura 34). En todas las líneas celulares evaluadas se observó que la IC₅₀ de CDDP se reducía drásticamente en la combinación con palbociclib (Tabla 5). De hecho, los estudios de interacción de compuestos mediante el método Chou-Talalay¹¹¹ mostraron que esta disminución de concentración era debida a una acción conjunta que incrementa la potencia de la mezcla (sinergia, índice <1) entre ambos compuestos (Tabla 5).



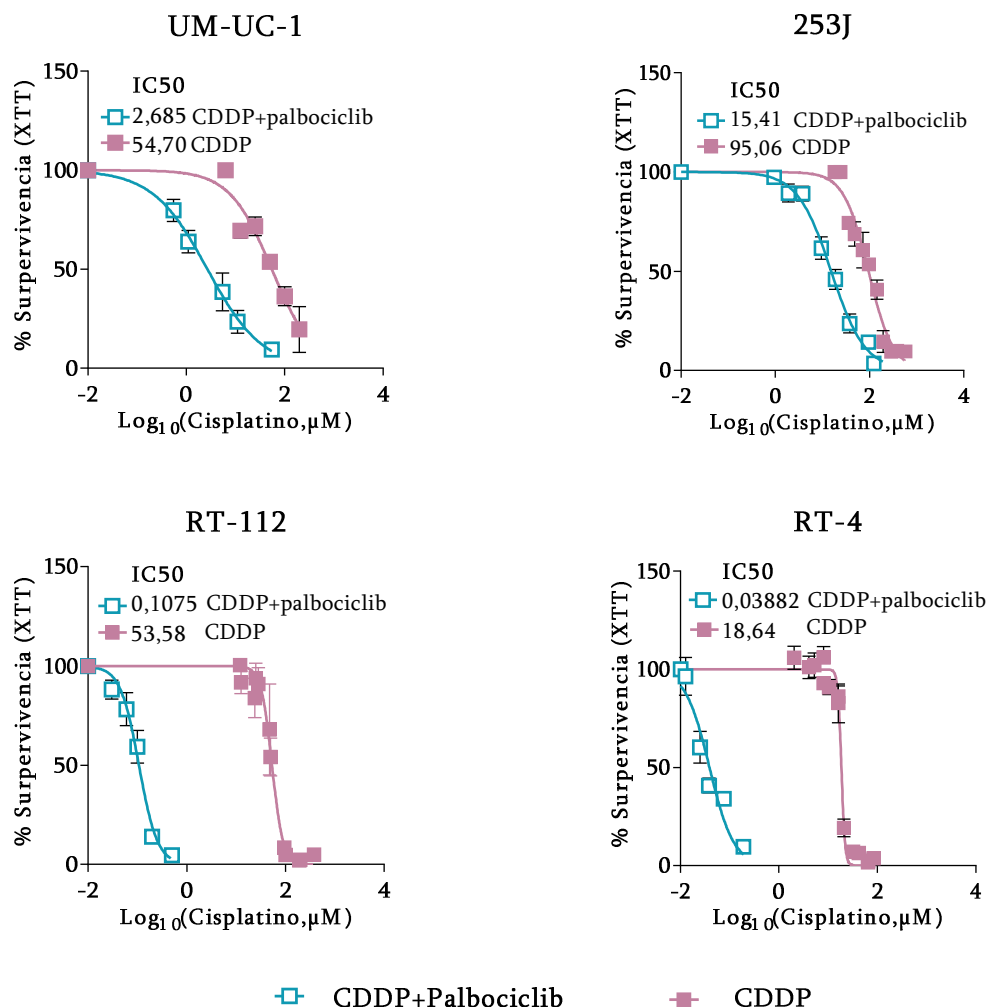


Figura 34. Ensayos de supervivencia de las líneas celulares de cáncer de vejiga a 24 horas de tratamiento con cisplatino (CDDP) y la combinación de CDDP y palbociclib. Representación gráfica que muestra la supervivencia celular de las seis líneas diferentes frente a la concentración del compuesto. Los nombres en rojo denotan las líneas celulares con mutación en *RBI* y los nombres en negro las líneas celulares sin mutación en *RBI*. Los datos son la media \pm SEM de 5-10 experimentos en los que cada punto se realizó por sextuplicado.

Línea celular	Reducción de IC50	IC
RT-112	498,4 \pm 1, 2	0,55 \pm 0,2
253J	6,2 \pm 1,2	0,88 \pm 0,2
RT-4	480,2 \pm 1,5	0,62 \pm 0,3
UM-UC-1	20,4 \pm 3,7	0,76 \pm 0,1
5637	37,5 \pm 4	0,63 \pm 0,2
J82	18,1 \pm 2,8	0,73 \pm 0,3

Tabla 5. Resumen del aumento de sensibilidad de CDDP como consecuencia del tratamiento con palbociclib en las líneas de cáncer de vejiga. Los datos muestran la reducción entre la IC50 de CDDP y la IC50 de CDDP más palbociclib. En la tercera columna se muestra el Índice de Combinación (IC) utilizando el método estadístico de Chou-Talalay. Los datos se acompañan de \pm SEM de 5-10 experimentos.

Resultados

4.2. Implicación de la expresión de FOXM1 y CDK4 en la sensibilidad a cisplatino.

Con objetivo de analizar el posible papel funcional de FOXM1 en el aumento de sensibilidad a cisplatino observado en la combinación con palbociclib, se determinó la sensibilidad a CDDP en las dos líneas celulares, tanto *RB1* wt (RT-112) como *RB1* mut (5637), que presentaban el aumento de expresión o silenciamiento de FOXM1 (Tabla 6). En ambas líneas celulares, observamos que el aumento de la expresión de FOXM1 incrementa la IC50 de cisplatino, mientras que cuando silenciamos FOXM1 la sensibilidad al compuesto es mayor. Por lo que concluimos que FOXM1 puede determinar la sensibilidad a cisplatino en nuestras líneas celulares y mediar el efecto sinérgico entre CDDP y palbociclib observado *in vitro*.

	Línea celular	
	RT-112 (<i>RB1</i> wt)	5637 (<i>RB1</i> mut)
Control (Ø)	50±3	33±5
FOXM1	63±3	98±7
shFOXM1	28±4	17±4
Valor <i>p</i> C vs FOXM1	0,004	0,002
Valor <i>p</i> C vs shFOXM1	0,005	0,004

Tabla 6. Resumen de la variación de sensibilidad a cisplatino tras el incremento (FOXM1) y la disminución (shFOXM1) de la expresión de FOXM1 en ambas líneas de cáncer de vejiga. Los datos muestran la IC50 (µM) de cisplatino con el silenciamiento y aumento de expresión de FOXM1. Se utilizaron como células control las líneas celulares parentales transfectadas con el vector vacío de la construcción utilizada. En las últimas columnas se muestra el valor *p* obtenido mediante un test de Mann-Whitney en la comparativa del control (C) frente al silenciamiento o aumento de expresión de FOXM1.

Por otro lado, evaluamos si el silenciamiento de CDK4 en ambas líneas celulares produce diferencias en los tratamientos con cisplatino y palbociclib por separado. En ambas líneas celulares, RT-112 y 5637, observamos que el silenciamiento de CDK4 no varía la sensibilidad a cisplatino (Tabla 7A). Sin embargo, con la reducción de los niveles de expresión de CDK4 el uso de palbociclib deja de ser efectivo en ambas líneas celulares (Tabla 7B).

A Cisplatino	Línea celular	
	RT-112 (<i>RBI</i> wt)	5637 (<i>RBI</i> mut)
Control (sh.inesp)	43,4±1	27,7±1
shCDK4	42,7±4	29,1±1,1

B Palbociclib	Línea celular	
	RT-112 (<i>RBI</i> wt)	5637 (<i>RBI</i> mut)
Control (sh.inesp)	1,5±1	2,8±1
shCDK4	>300	>600

Tabla 7. Resumen de la variación de sensibilidad a cisplatino y palbociclib tras el silenciamiento de CDK4 en ambas líneas de cáncer de vejiga. (A) Los datos muestran la IC50 (μ M) de cisplatino con el silenciamiento de CDK4. **(B).** Los datos muestran la IC50 (μ M) de palbociclib con el silenciamiento de CDK4.

4.3. Papel de FOXM1 en la acción combinada de palbociclib y cisplatino.

A continuación, estudiamos si la sinergia entre cisplatino y palbociclib podría verse afectada por diferentes niveles de expresión de FOXM1. Por ello, realizamos un análisis de cooperación entre ambos compuestos utilizando las líneas celulares RT-112 (*RBI* wt) y 5637 (*RBI* mut) con aumento de expresión y disminución de FOXM1 (**Tabla 8**). Los resultados indican que la sinergia existente entre cisplatino y palbociclib se mantiene independientemente de los niveles de expresión de FOXM1 en las células *RBI* mut (5637) (**Tabla 8A**), mientras que la disminución de FOXM1 en las células *RBI* wt (RT-112) produjo un efecto aditivo y no sinérgico entre ambos compuestos (**Tabla 8B**).

A	Línea celular 5637 (<i>RBI</i> mut)	Índice de Combinación	Tipo de interacción
	Control (Ø)	0,75	Sinergia
	FOXM1	0,83	Sinergia
	shFOXM1	0,88	Sinergia

B	Línea celular RT-112 (<i>RBI</i> wt)	Índice de Combinación	Tipo de interacción
	Control (Ø)	0,65	Sinergia
	FOXM1	0,86	Sinergia
	shFOXM1	0,98	Adición

Tabla 8. Resumen del índice de combinación de cisplatino y palbociclib en las líneas celulares de cáncer de vejiga con aumento de expresión o disminución de FOXM1. En la columna de la derecha se indica el tipo de interacción farmacológica en base al índice de combinación obtenido.

4.4. Efecto de la combinación de palbociclib y cisplatino *in vivo* en un modelo de xenoinjerto de líneas celulares de cáncer de vejiga.

Con el objetivo de comprobar si la sinergia entre palbociclib y cisplatino es funcional en un sistema *in vivo*, se realizaron xenoinjertos de las células RT-112 (*RB1* wt) y 5637 (*RB1* mut) en los flancos de ratones inmunodeficientes *Foxn1^{nu/nu}*, que posteriormente fueron tratados con los diferentes compuestos. Los grupos de tratamientos (n=5 por grupo) se dividieron en animales tratados con el vehículo, palbociclib, cisplatino y la combinación de palbociclib más cisplatino (Figura 35).

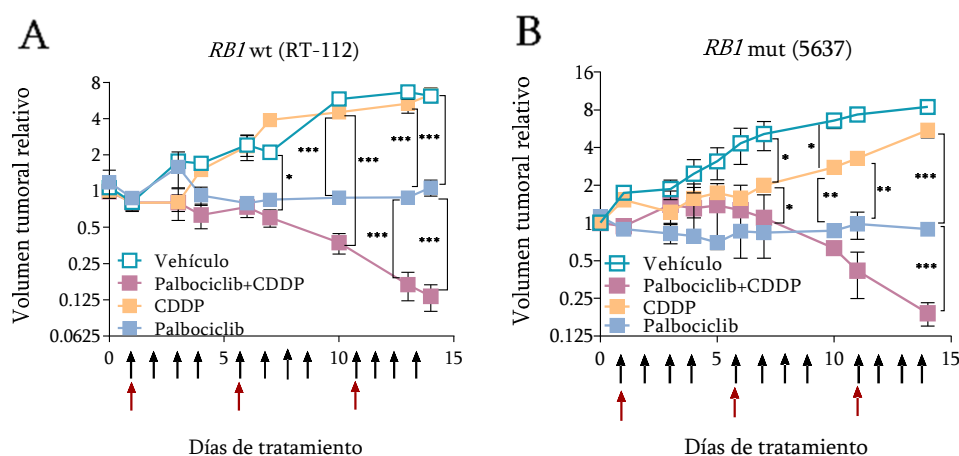


Figura 35. Resumen de los efectos de los distintos tratamientos (palbociclib, CDDP y palbociclib más cisplatino) en el crecimiento tumoral de xenoinjertos derivados de las líneas celulares RT-112 (A) y 5637 (B). Las flechas negras y rojas indican los puntos temporales de la administración de palbociclib y cisplatino, respectivamente. (*) $p \leq 0,05$; (**) $p \leq 0,01$; (***) $p \leq 0,005$.

En las gráficas se puede observar que el tratamiento con cisplatino no tuvo efectos significativos en el crecimiento tumoral en ninguno de los casos a final del tratamiento. Sin embargo, tanto el tratamiento con palbociclib, como el tratamiento combinado de ambos compuestos produjeron una reducción significativa en el crecimiento tumoral (Figuras 35).

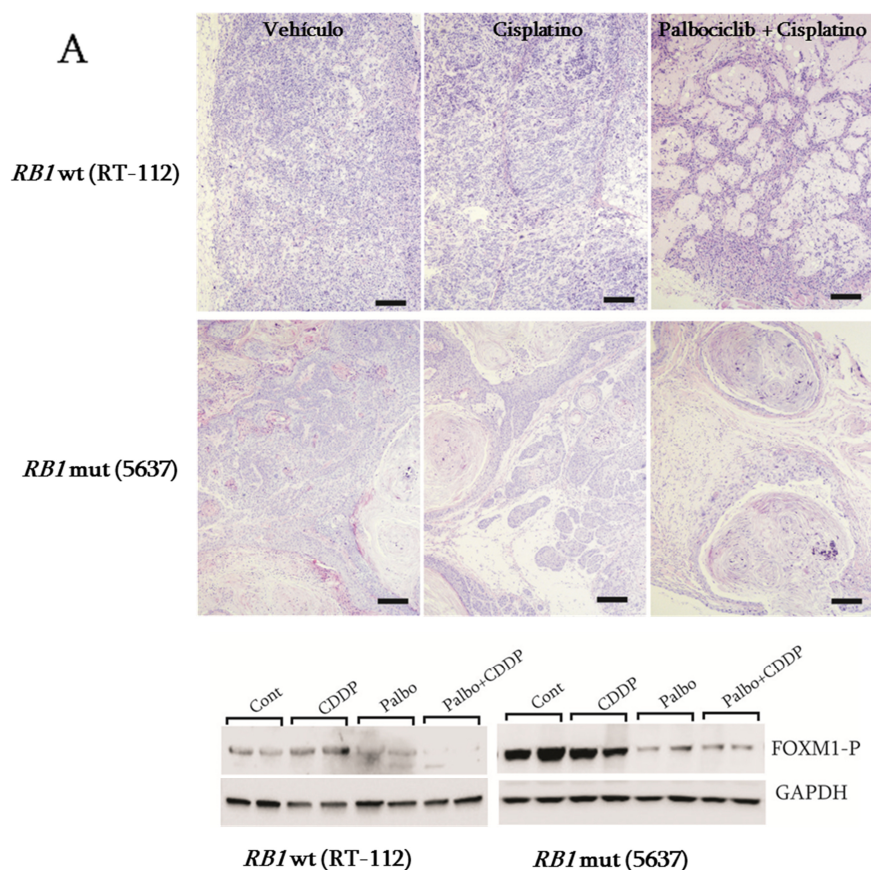
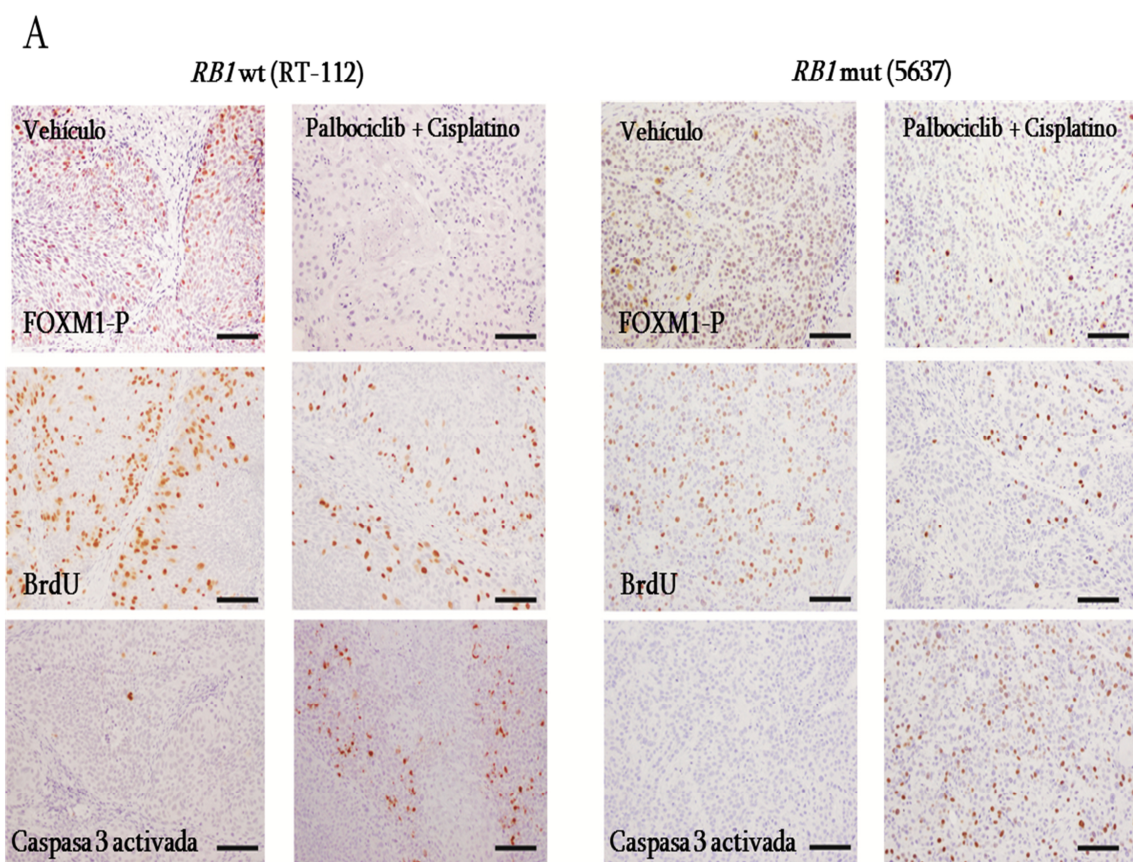


Figura 36. Caracterización de los xenoinjertos derivados de las líneas tumorales. (A) Fotografías representativas de tinciones con hematoxilina-eosina de los tumores derivados de las líneas celulares RT-112 (arriba, *RB1* wt) y 5637 (abajo, *RB1* mut). Barras de escala = 250 μ m. (B) Western blot de los xenoinjertos tumorales de las células RT-112 y 5637 que muestran la reducción en la fosforilación de FOXM1 (Thr600) como consecuencia de los tratamientos con palbociclib y palbociclib más cisplatino.

La caracterización histológica de estos tumores mostró una severa reducción de la celularidad tras el tratamiento combinado (**Figura 36A**). Asimismo, el análisis de la expresión proteica realizada mediante western blot mostró una reducción significativa en la fosforilación de FOXM1 después del tratamiento con palbociclib y del tratamiento combinado con palbociclib más cisplatino (**Figura 36B**).

Resultados

Estos resultados fueron confirmados mediante una caracterización inmunohistoquímica que mostró niveles disminuidos de FOXM1-P (Thr 600), inhibición de la proliferación (mediante el marcaje con BrdU) y una inducción visible de apoptosis en los tumores de los ratones tratados (mediante marcaje de caspasa-3 activada) (**Figura 37**).



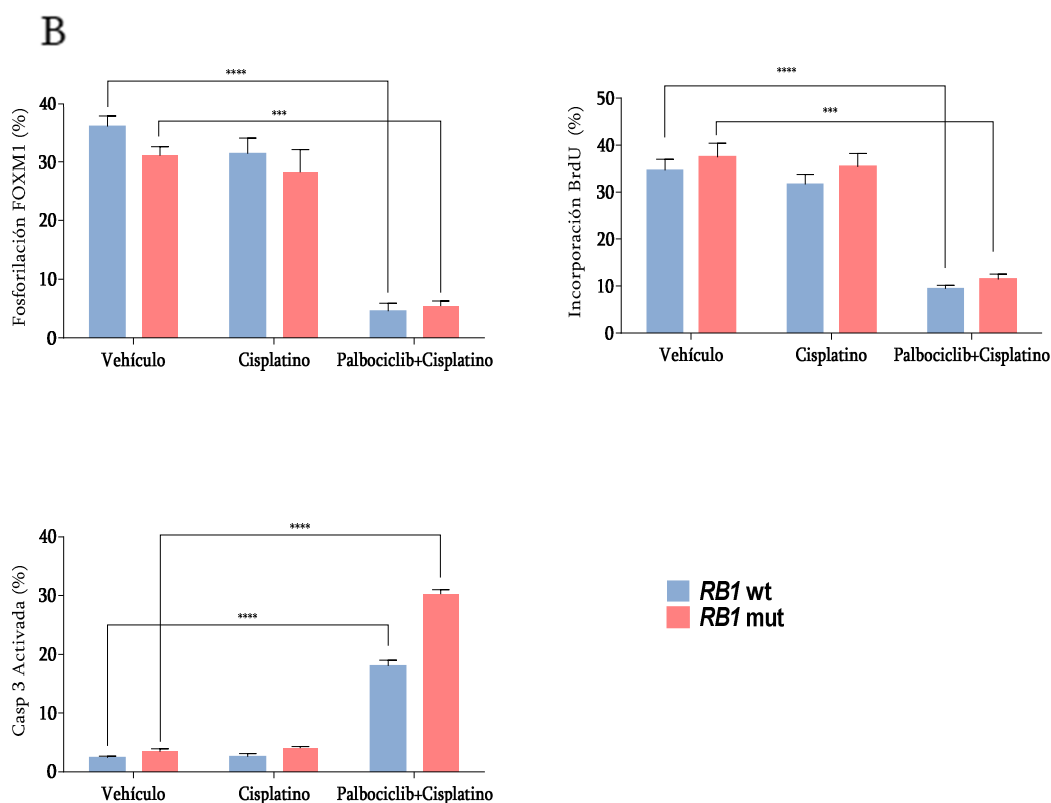


Figura 37. Caracterización inmunohistoquímica de los xenoinjertos derivados de las líneas tumorales. (A) Ejemplos representativos de tinciones inmunohistoquímicas de FOXM1 fosforilado (Thr600), bromodesoxiuridina (BrdU) y caspasa 3 activa de tumores derivados de las líneas celulares RT-112 y 5637 tratados con el vehículo y la combinación de palbociclib más cisplatino. Barras = 150 μ m. (B) Resumen de los análisis cuantitativos de la tinción en A. Los datos provienen de 5 tumores diferentes para cada condición (tres fotografías independientes) y se muestran como media \pm SEM. (****) $p \leq 0,0001$; (***) $p \leq 0,0005$; según lo determinado en el test de Mann-Whitney.

En conjunto, estos resultados revelan que la actividad del inhibidor de CDK4/6 muestra un efecto sinérgico con cisplatino, permitiendo una reducción significativa en la dosis de este agente quimioterapéutico tanto *in vitro* como *in vivo*. Este efecto puede estar mediado por la presencia de FOXM1, el cual determina la sensibilidad a cisplatino.

5. Empleo de palbociclib en combinación con cisplatino en un modelo de ratón inmunocompetente de cáncer de vejiga metastásico.

5.1. Caracterización del ratón *Rb1^{FF}*, *Pten^{FF}*, *Trp53^{FF}* y *Rb1^{-/-}* como modelo de cáncer de vejiga metastásico.

Tras obtener los resultados de las pruebas *in vitro* e *in vivo* mostrados en los apartados anteriores, decidimos estudiar el efecto de palbociclib en un contexto más fisiológico y similar al de los pacientes de CUMI. Los tumores uroteliales invasivos surgen a partir de la combinación de múltiples alteraciones genómicas simultáneas, entre las que se destacan las de los genes *TP53*, *RB1* y *PTEN*¹³⁰. De forma paralela, las proteínas de la familia pRB, incluida la propia pRB, p107 y p130, se expresan de manera uniforme en todos los estratos celulares del urotelio, lo que parece indicar que desempeñan un papel redundante en la progresión del ciclo celular urotelial. En trabajos previos del laboratorio se demostró que la pérdida de pRB no es suficiente para producir tumorigénesis. Sin embargo la pérdida de pRB, produce una compensación funcional por parte de p107¹³¹. Debido a todo esto, utilizamos un modelo de ratón transgénico de cáncer de vejiga metastásico cuádruple knockout (CKO) basado en la pérdida de tres genes supresores de tumores (*Rb1*, *Pten*, *Trp53*), en un ratón nulo o knockout para *Rb11*. Para inducir la generación de los tumores uroteliales se inyectó el adeno-K5-Cre en la luz de la vejiga, provocando así la delección de estos genes en las células basales del urotelio, hecho que fue confirmado mediante la utilización de ratones que portan un LoxP-Stop-LoxP-LacZ en el locus ROSA26. Después de 90-120 días de la inoculación intravesical del adeno-K5-Cre, los ratones (n=20) presentaron lesiones tumorales vesicales. Estos tumores se caracterizan por invadir la capa muscular de la vejiga (**Figura 38A**), afectando a tejidos circundantes y presentando, en todos los casos, metástasis distales dentro de la cavidad peritoneal (**Figura 38B**) y, en menor medida, en el hígado y los pulmones (**Figura 38C**).

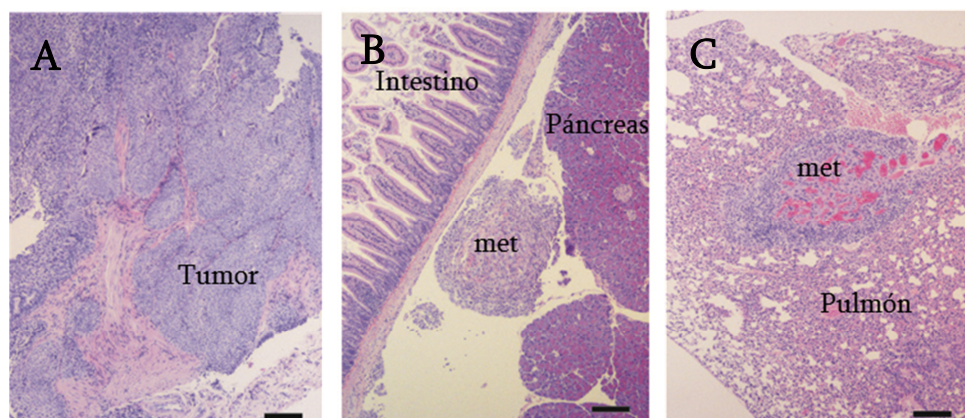


Figura 38. Imágenes representativas de la histología de los tumores primarios y metástasis del modelo CKO (*Rb1^{FF}*, *Pten^{FF}*, *Trp53^{FF}* y *Rbl1^{-/-}*). (A) Ejemplo de la morfología histológica de una muestra de tumor vesical del modelo CKO. (B y C) Ejemplos de metástasis (met) en la cavidad peritoneal (B) y en los pulmones pulmonar (C). Barras de escala =150 μ m.

Con el objetivo de estudiar en mayor profundidad este modelo animal, llevamos a cabo la caracterización del transcriptoma completo de los tumores primarios y sus metástasis, empleando como controles tejido urotelial aislado de vejigas sin inoculación del virus. A partir de los datos de expresión génica de dichas muestras, se llevó a cabo un agrupamiento jerárquico supervisado, es decir, un agrupamiento de los genes diferencialmente expresados que agrupan las muestras según sean tejido urotelial sin inoculación del virus (controles), tumores primarios (tum) y metástasis (met).

Resultados

Como podemos ver en la **Figura 39A**, los tumores y las metástasis experimentan cambios importantes en el transcriptoma respecto a los controles, observando una represión de 720 transcritos y un aumento de expresión de 727 transcritos. El análisis de ontología génica de los genes que se expresan de forma diferencial entre los distintos tipos muestrales reveló que los tumores presentan una represión significativa principalmente en genes relacionados con la organización muscular, la señalización por VEGF, la señalización intracelular y extracelular, así como la organización de la matriz extracelular (MEC), mientras que los genes inducidos se encuentran involucrados en el ciclo celular, la reparación/replicación del ADN y en la remodelación de la cromatina (**Figura 39B**). Además, empleando la herramienta informática Enrich webtool, observamos que los genes que presentan un aumento de sus niveles de expresión en los tumores y las metástasis parecen estar regulados principalmente por los factores de transcripción de la familia E2F, MYC y, de una manera notable, FOXM1 (**Figura 39C**). Por otro lado, entre los factores de transcripción que parecen regular la expresión de los genes reprimidos en las muestras tumorales y las metástasis se incluyen algunos miembros del complejo Polycomb, como SUZ12 o EZH2 (**Figura 39D**), de los cuales está descrito que poseen características oncogénicas en cáncer de vejiga.

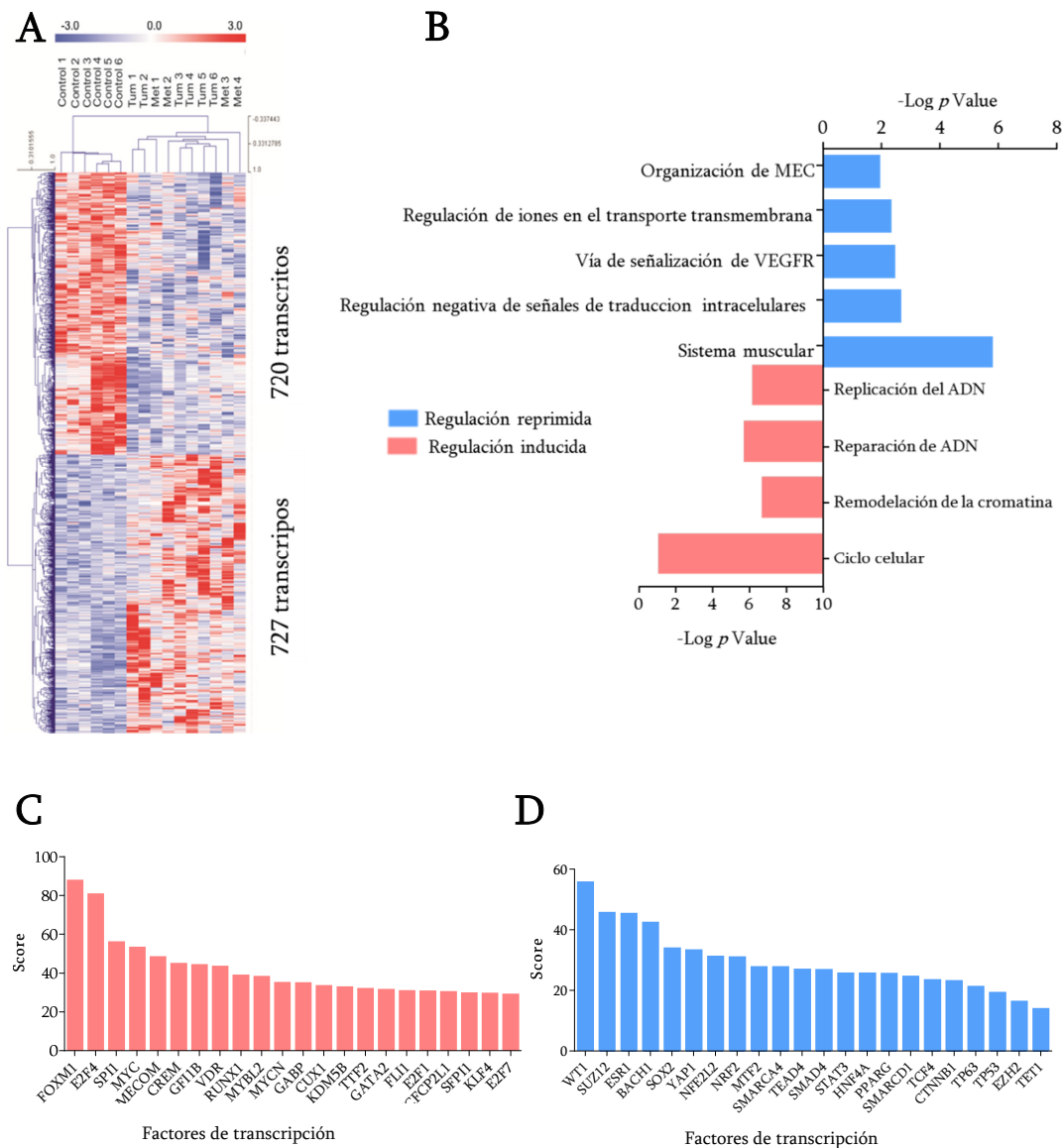


Figura 39. Análisis funcional de las alteraciones transcripcionales de los tumores del modelo animal frente a los controles. A) “Heatmap” mostrando los genes reprimidos (azul) o con aumento de expresión (rojo) entre el tejido urotelial normal (control) vs tumoral (tum) y metástasis (met). **B)** Análisis mediante Ontología Génica de los procesos biológicos en los que están involucrados los genes con expresión reducida (azul) o aumentada (rojo). **C y D)** En la gráfica se muestra el análisis de los factores de transcripción que tienen sitios de unión a los genes con expresión inducida (**C**) y reducida (**D**) en los tumores respecto al urotelio normal usando el algoritmo Enrichr webtool (<http://amp.pharm.mssm.edu/Enrichr/>)^{40,132}.

Resultados

Estos resultados se confirmaron mediante el uso de un análisis de enriquecimiento en grupos de genes (GSEA). En este análisis los transcritos diferencialmente expresados en las muestras tumorales de ratón mostraron un enriquecimiento en genes diana de factores de transcripción como E2F y MYC, relacionados con el control de la proliferación, así como en genes implicados en el proceso de TEM (Transición Epitelio Mesénquima) (**Figura 40**).

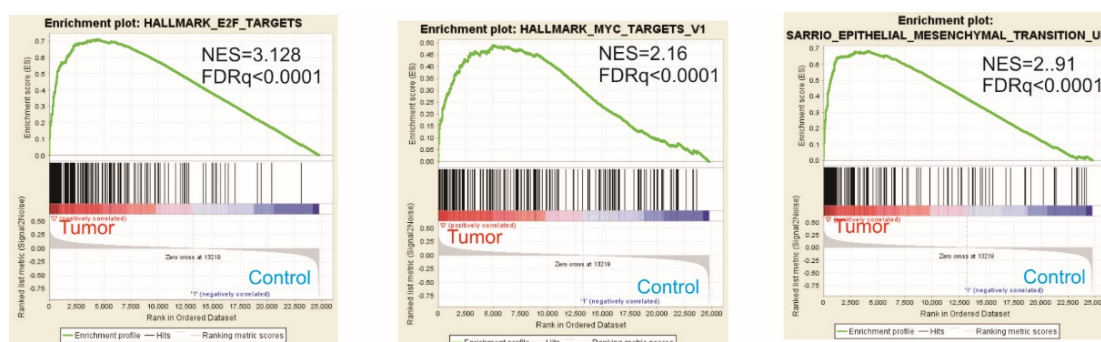


Figura 40. Análisis de enriquecimiento en grupos de genes (GSEA). En las gráficas se observa que los tumores generados en el modelo transgénico presentan un enriquecimiento en genes diana de E2F y MYC, y en procesos como TEM. FDR: “false discovery rate”; “NES: “normalized enrichment score”.

5.2. Caracterización comparativa de los tumores uroteliales generados en el modelo de ratón CKO con el CU humano.

Debido a las características metastásicas de los tumores obtenido en el ratón decidimos estudiar si las características moleculares obtenidas son similares a algún subtipo tumoral de CU. El análisis de GSEA de los genes aumentados en los tumores respecto al urotelio normal de ratón, reveló que dichos genes aumentados se encuentran en un patrón similar en el subtipo basal escamoso, y de forma opuesta en los subtipos luminal y luminal papilar de CU humano (subtipos de TCGA) (**Figura 41**).

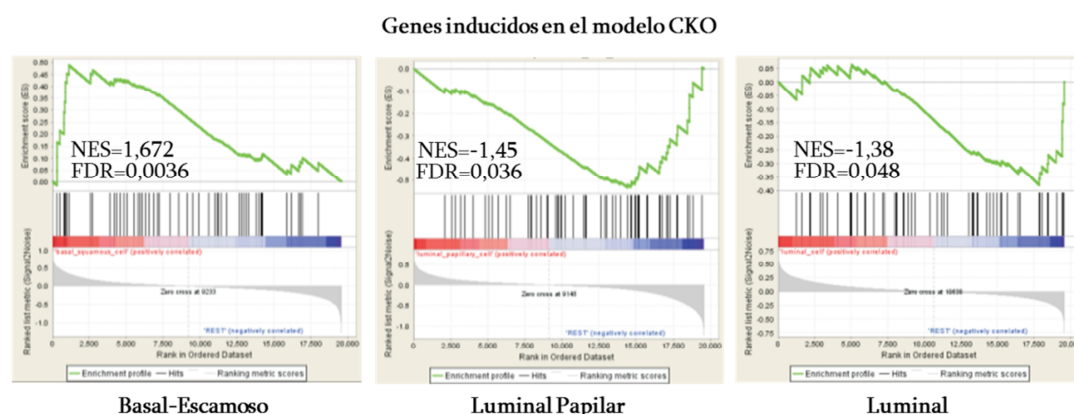


Figura 41. Análisis de enriquecimiento en grupos de genes (GSEA) de los tumores del modelo transgénico CKO frente a los distintos subtipos tumorales humano del TCGA. En las gráficas se observa que los genes inducidos en los tumores generados en el modelo transgénico presentan un enriquecimiento significativo en el subtipo basal-escamoso humano de TCGA, y un enriquecimiento negativo en los subtipos Luminal Papilar y Luminal de TCGA. FDR: “false discovery rate”; “NES: “normalized enrichment score”.

Por otro lado, en los tumores obtenidos del modelo de ratón CKO con delección en p107, pRB, p53 y PTEN, encontramos un aumento de la fosforilación de S6, AKT, ERK y STAT3, respecto de urotelio normal de ratón (**Figura 43**). En base a estos resultados, investigamos si estas características estaban asociadas con algún grupo específico de CU humano. Utilizando un método de agrupación denominado “Self-organizing map” a partir de datos proteómicos de muestras humanas de CU contenidos en la base de datos TCGA pudimos ver que dos grupos de la matriz obtenida en este análisis (denominados 6 y 9), mostraron el patrón de proteínas con reducción de PTEN, y un incremento de actividad de AKT, ERK, S6 y STAT3 (**Figura 42A**), similar al encontrados en las muestras de tumores murinos. Cuando comparamos las características de los grupos 6 y 9 unidos, frente a los grupos restantes o a la serie completa de todos los grupos podemos observar que estos dos grupos se encuentran enriquecidos significativamente en los subtipos basal-escamoso, luminal infiltrado y neuronal (**Figura 42B**).

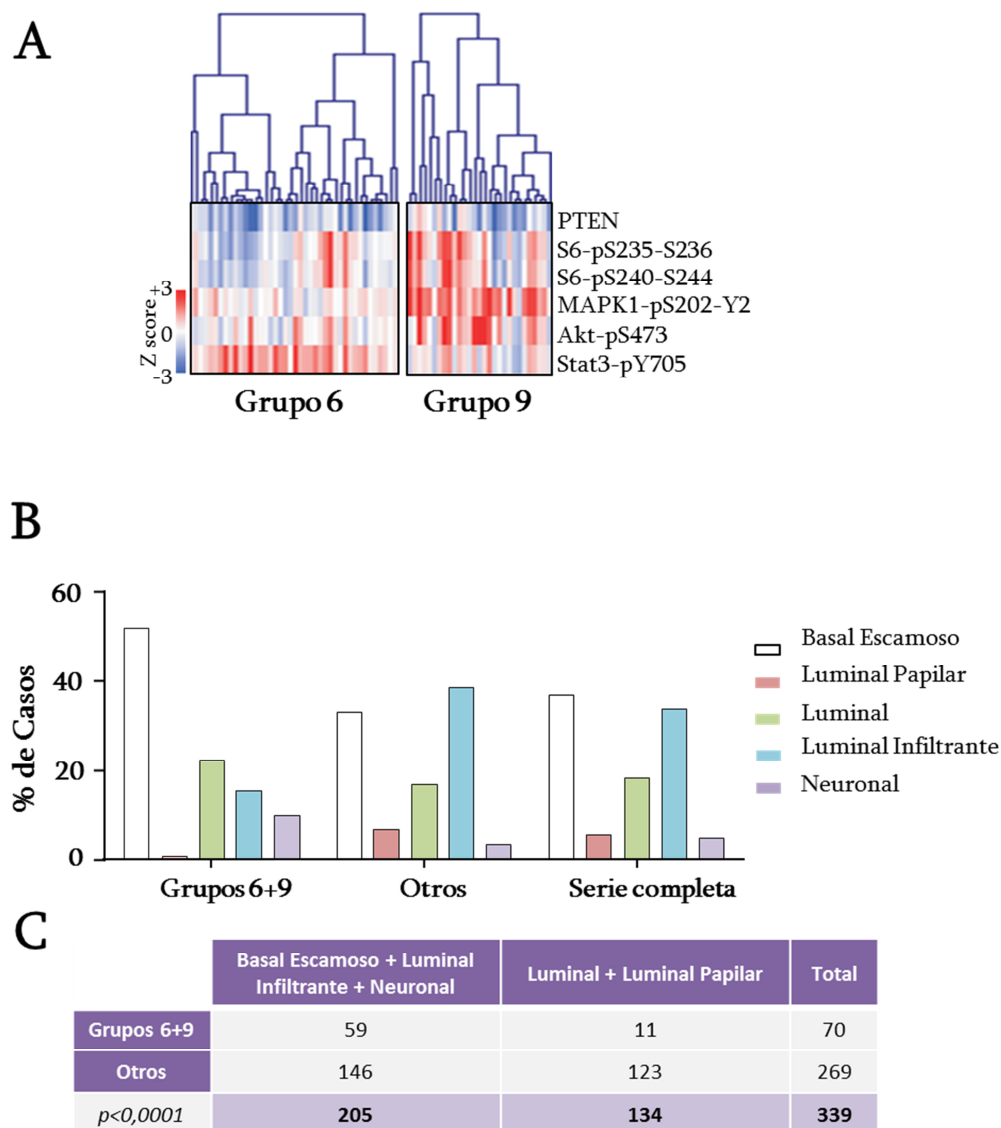


Figura 42. Análisis de agrupación de muestras humanas con CU (TCGA) procedentes de *Proteomics Reverse Phase Protein Arrays* (RPPA) con las muestras tumorales obtenidas del modelo animal CKO. (A) “Heatmap” representando la expresión de las formas fosforiladas de los genes de interés en los grupos similares entre los tumores de TCGA y los tumores de los ratones CKOs. (B) Porcentaje de casos donde se observa un enriquecimiento en el subtipo basal escamoso, luminal infiltrante y neural respecto a los subtipos luminal papilar en el grupo 6+9. El p valor se obtuvo mediante la prueba estadística de Fisher. (C) Número de casos correspondiente a cada uno de los subtipos moleculares clasificados de acuerdo a los niveles de expresión de los marcados indicados y agrupados en los grupos 6+9 y resto en TCGA.

Estos dos grupos (6 y 9) se caracterizan por la presencia de mutaciones en los supresores tumorales *TP53* y *RB1* de manera simultánea (**Figura 43A**), una mayor incidencia de metástasis al diagnóstico (**Figura 43B**) y una reducción de la supervivencia global en pacientes de CU (**Figura 43C**).

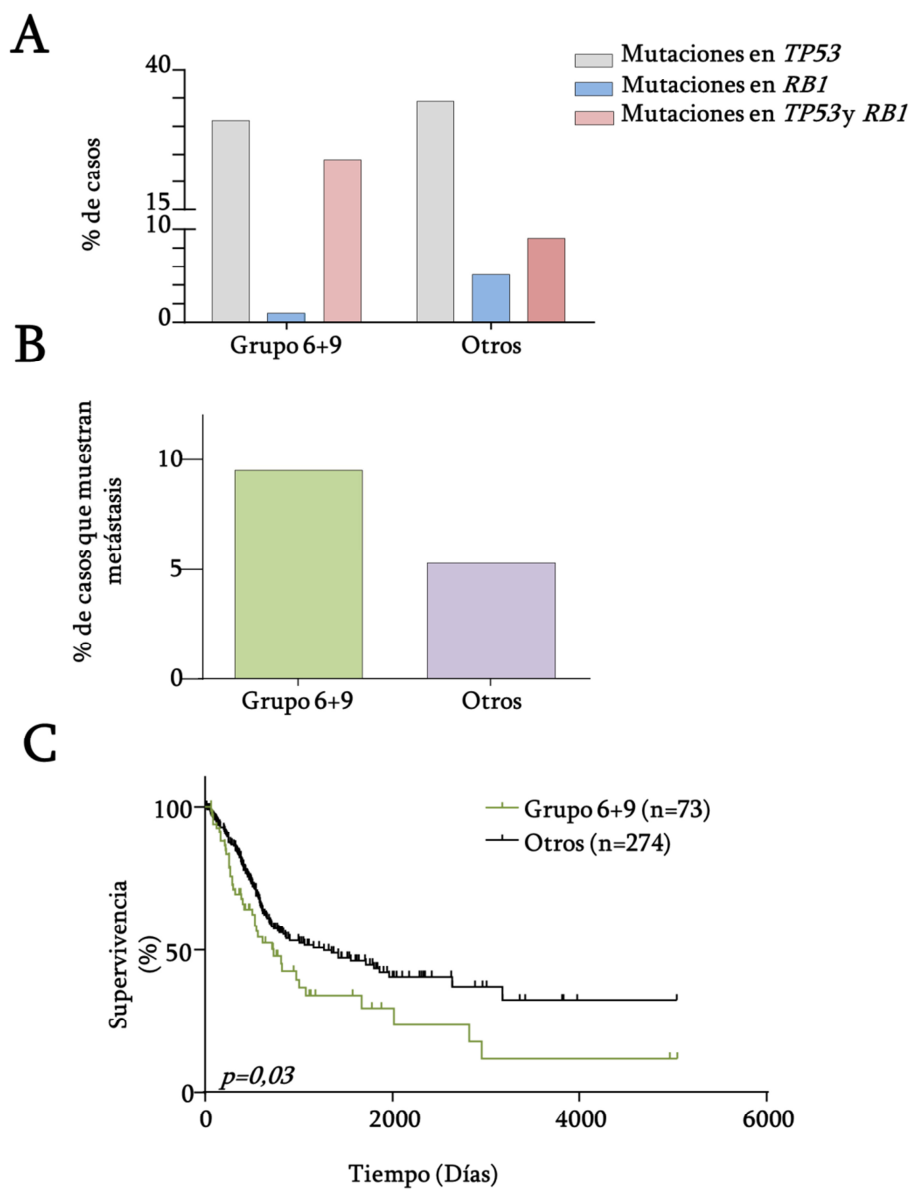


Figura 43. Caracterización del grupo 6+9 por presencia de mutación en *TP53* y *RB1* (A), metástasis (B) y supervivencia (C) de los pacientes humanos con CU (TCGA). El valor p fue obtenido mediante la prueba estadística de Log-Rank.

5.3. Caracterización de los tumores uroteliales generados en el modelo de ratón CKO tratados con palbociclib y cisplatino.

Dadas las características del modelo de ratón y sus similitudes con las características del cáncer de vejiga avanzado en humanos, decidimos estudiar la efectividad del tratamiento combinado de palbociclib más cisplatino. Después de 90-120 días de la inoculación intravesical del adeno-K5-Cre, los ratones (n=40) fueron divididos en dos grupos de tratamiento (n=20 por grupo), animales tratados con el vehículo, y animales tratados con la combinación de palbociclib más cisplatino. Comprobamos que el tratamiento combinado de ambos compuestos produce un incremento significativo de la supervivencia de los animales tras la aparición de los tumores y una disminución severa de la carga metastásica (**Figura44**).

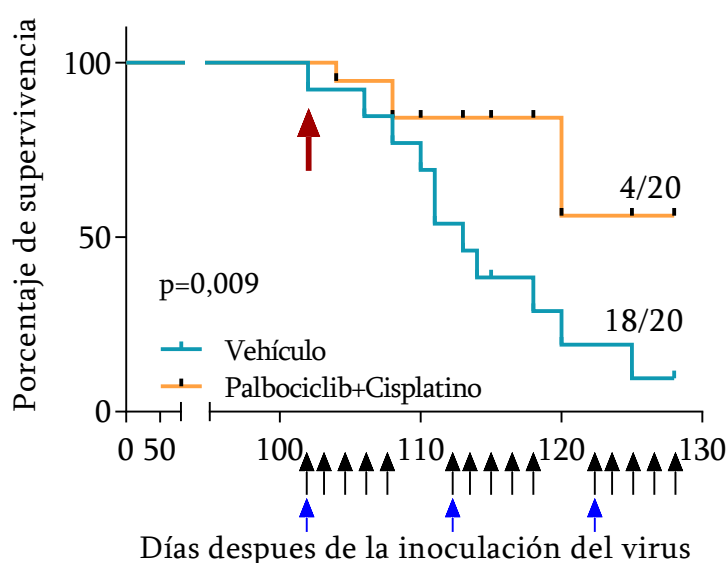
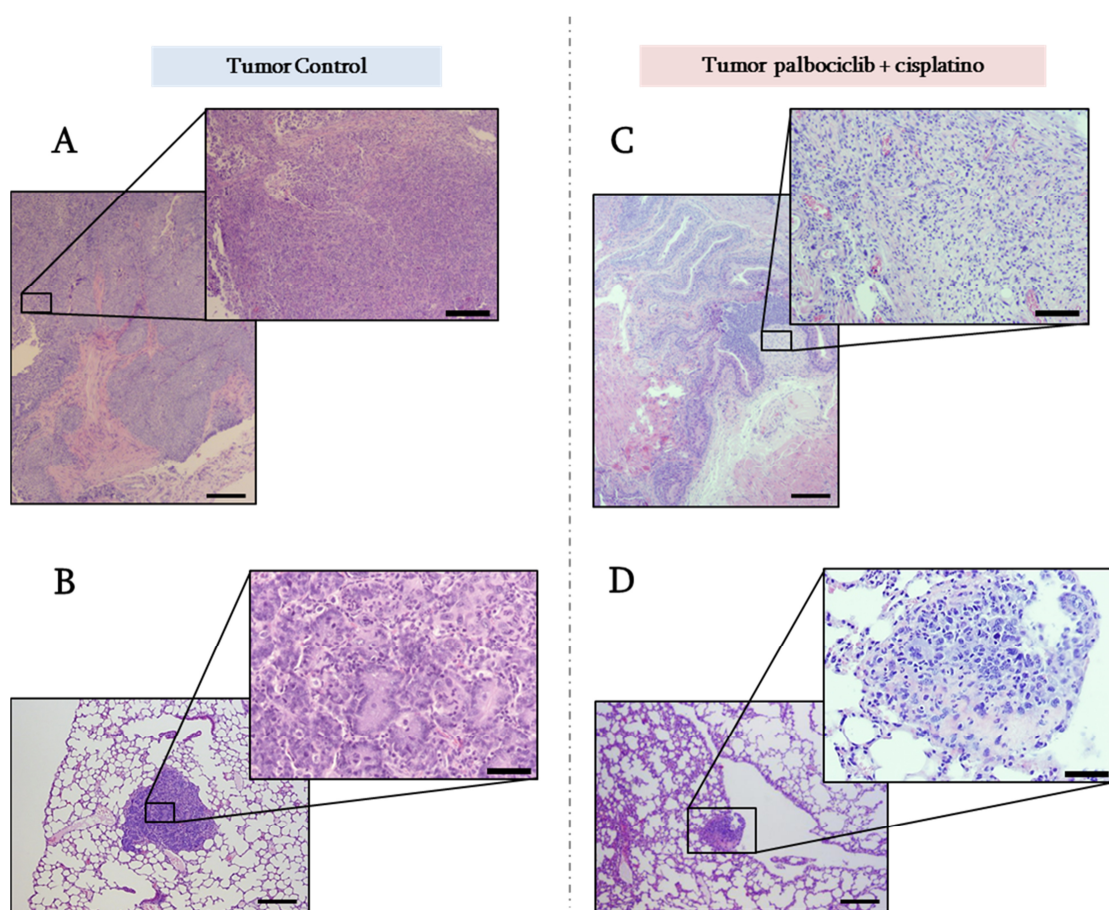


Figura 44. Análisis Kaplan-Meier de la supervivencia de los ratones CKO con y sin el tratamiento de palbociclib más cisplatino. Se muestran las curvas de Kaplan-Meier donde se observa la supervivencia tras el tratamiento de los ratones en la cohorte de control y en la tratada con palbociclib más cisplatino (n=20 por grupo). El valor de p se obtuvo usando el test Log-Rank de comparación de curvas de supervivencia. La flecha roja denota el inicio del tratamiento. Las flechas negras y azules indican los puntos temporales de administración de palbociclib y cisplatino, respectivamente. Los números mostrados en cada curva indican los ratones que muestran metástasis en cada cohorte respecto al número total de animales por grupo.

Tras la necropsia de los animales de los diferentes grupos, el análisis histológico de los diferentes órganos que fueron evaluados mostró que, a diferencia de la cohorte control, que como hemos mencionado antes muestran tumores invasivos (**Figura 45A**) y metástasis en órganos distales como por ejemplo el pulmón (**Figura 45B**), en la cohorte de los ratones tratados con la combinación de palbociclib y cisplatino se observan principalmente remanentes tumorales con una reducción de la invasión de la capa muscular (**Figura 46C**). Además, en el grupo tratado con la combinación de palbociclib y cisplatino también se observan claros signos de regresión tumoral (**Figura 46D**) con amplias zonas necróticas e infiltrados linfocitarios que afectan tanto a los tumores como a las metástasis (**Figura 46EF**).



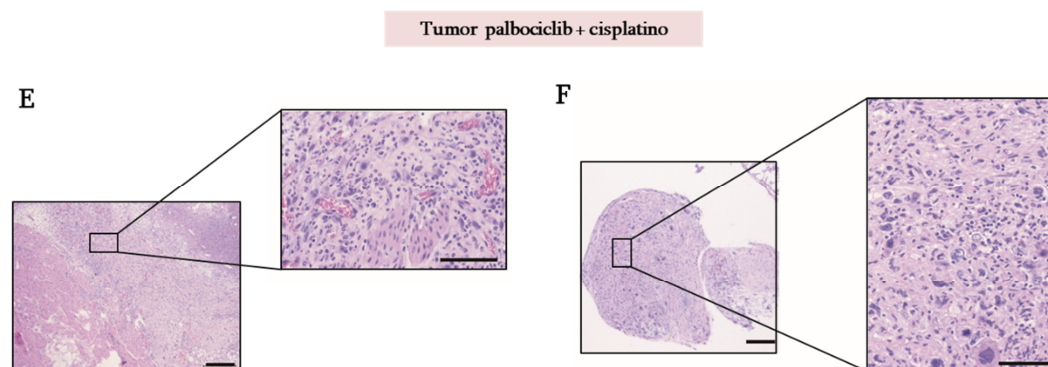


Figura 46. Imágenes histológicas representativas de tumores uroteliales y metástasis de los ratones CKO de la cohorte control (A, B) y de los tumores uroteliales y metástasis de los ratones CKO de la cohorte tratada con palbociclib más cisplatino (C, D). (A) Tumor urotelial perteneciente a un ratón CKO tratado con el vehículo (Control). (B) Metástasis pulmonar perteneciente a un ratón CKO tratado con el vehículo (Control). (C) Tumor urotelial perteneciente a un ratón CKO tratado con la combinación de palbociclib más cisplatino. (D) Metástasis pulmonar perteneciente a un ratón CKO tratado con la combinación de palbociclib más cisplatino. (E) Metástasis peritoneal perteneciente a un ratón CKO tratado con la combinación de palbociclib más cisplatino con infiltrado linfocitario. (F) Tumor perteneciente a un ratón CKO tratado con la combinación de palbociclib más cisplatino. Barras de escala=150 μ m en las imágenes inferiores de cada una de las figuras y barra de escala=250 μ m en las ampliaciones superiores de cada una de las figuras.

La caracterización inmunohistoquímica de estos tumores reveló una inhibición significativa de la proliferación, como lo indica la disminución de la incorporación de BrdU y la disminución de la fosforilación de la histona 3 fosforilada (pH3), acompañado de una inducción de la apoptosis por aumento de caspasa3 activada (**Figura 47**). Al analizar de igual manera la cantidad de FOXM1 fosforilado en Thr600 se vio que esta fosforilación estaba claramente inhibida tras el doble tratamiento de palbociclib más cisplatino tanto en la tinción histológica por inmunohistoquímica como en el análisis por western blot (**Figura 48A-F**). Sin embargo, al analizar otras vías de señalización relacionadas con la carcinogénesis, no se vio una inhibición significativa en los ratones con el doble tratamiento de las vías de AKT (Ser473), STAT 3 (Tyr705) o ERK (Thr202/Tyr204) en los tumores de los ratones tras el doble tratamiento (**Figura 48B, C, D**). No obstante, si se observó una disminución de los niveles de expresión de EZH2 total tanto en la tinción inmunohistoquímica de los tumores como en el análisis por western blot (**Figura 48EF**).

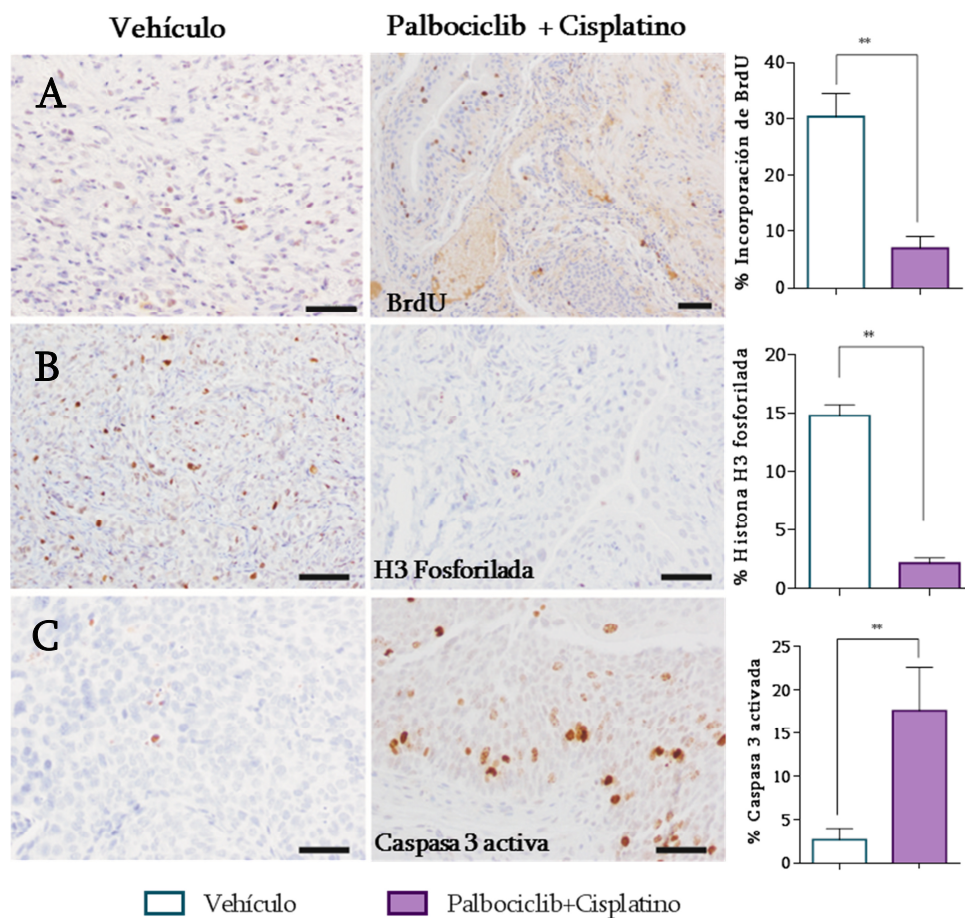


Figura 47. Inmunohistoquímicas representativas de BrdU (A), fosforilación de la histona H3 (B) y apoptosis analizada por los niveles de caspasa-3 activada (C) en tumores uroteliales de ratones CKO tratados con el vehículo y con la combinación de palbociclib y cisplatino. A la izquierda, ejemplos representativos de inmunohistoquímicas de tumores tratados con el vehículo; paneles intermedios, ejemplos representativos de inmunohistoquímicas de tumores tratados con palbociclib y cisplatino. A la derecha se muestran los análisis cuantitativos de cada una de las tinciones. Los datos provienen de 5 tumores diferentes para cada condición (tres imágenes independientes) y se muestran como media \pm SEM. (**) $p < 0,01$; según lo determinado por el test de Mann Whitney. Barras de escala =150 μ m.

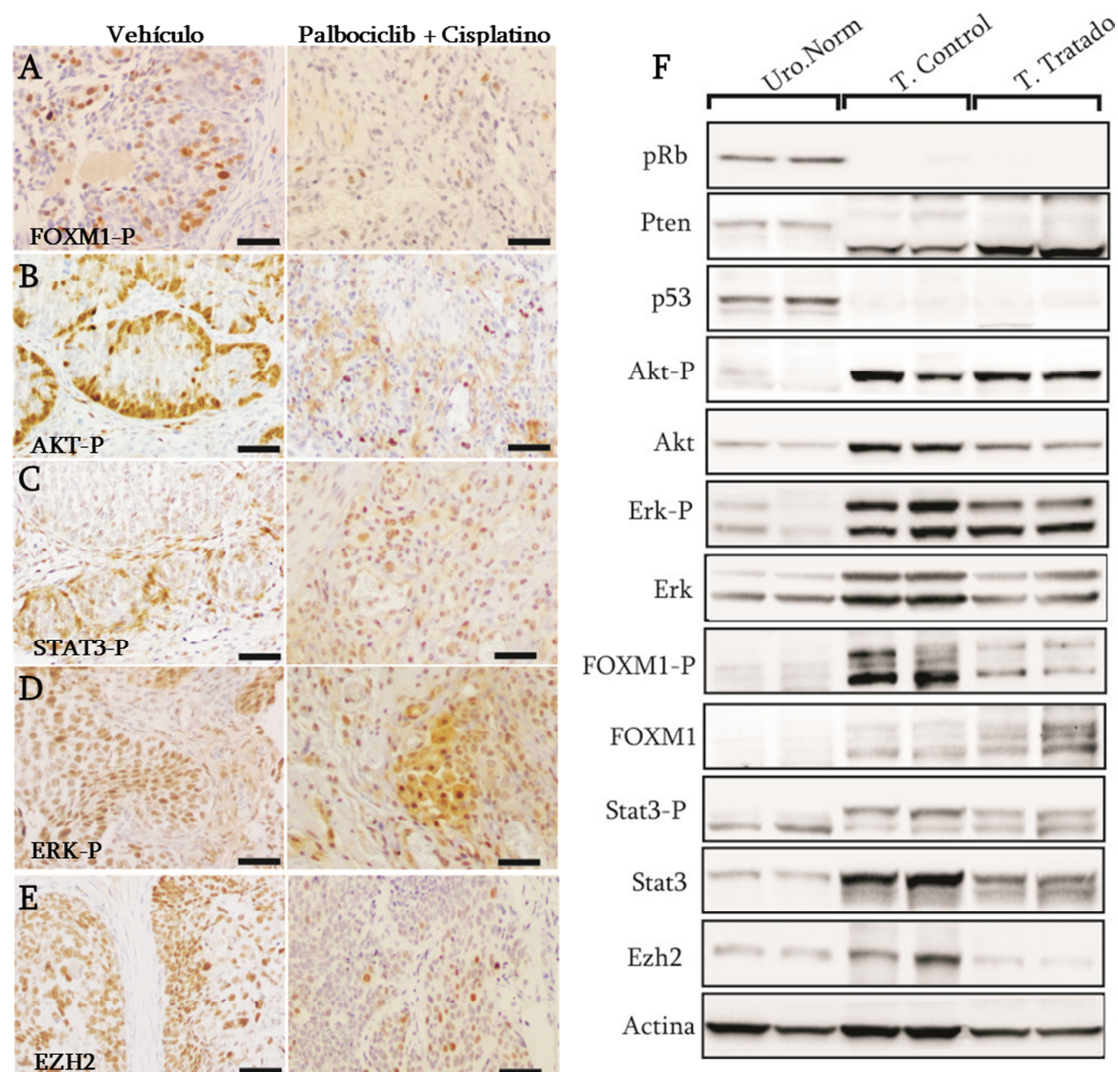


Figura 48. Imágenes representativas de inmunohistoquímicas y western blot de tumores controles y de tumores de vejiga de ratones CKO tratados con cisplatino y palbociclib. En ellos se muestra la reducción en FOXM1 fosforilado (A), pero no en AKT fosforilado (B), STAT3 (C) o ERK (D) como consecuencia del tratamiento. (E) La expresión de EZH2 que se reduce severamente en muestras de vejiga de ratón tratadas con palbociclib y cisplatino. (F) Análisis de western blot de urotelio normal, tumores tratados con el vehículo, y tumores tratados con cisplatino y palbociclib de todas las proteínas citadas. Todas las proteínas se normalizaron utilizando la expresión de β -actina. Barras de escala=150 μ m.

Con el objetivo de comprender en mayor profundidad el efecto provocado por el tratamiento combinado de palbociclib y cisplatino en el modelo CKO, se realizaron análisis transcriptómicos de tejido urotelial normal pertenecientes a ratones sin inoculación del vector adenoviral (control), tumores y metástasis de ratones tratados con el vehículo, y tumores y metástasis pertenecientes a ratones tratados con palbociclib y cisplatino. En el análisis de agrupamiento de genes diferencialmente

expresados de los controles frente a las muestras tumorales mostró que los tumores tratados con la combinación de palbociclib y cisplatino (palbo) se agrupan junto con el grupo perteneciente a tejido urotelial normal (control), lo cual es indicativo de que su perfil de expresión génica es más similar al urotelio normal que al del tumor sin tratamiento (**Figura 49A**). El análisis de los factores de transcripción relacionados con la regulación génica de los transcritos diferenciales entre los tumores tratados y controles frente a los tumores y metástasis sin tratamiento revelaron que, aunque no se encontró una implicación significativa de los reguladores transcripcionales u ontologías genéticas en el caso de los transcritos regulados positivamente, se detectó una regulación preferencial por FOXM1 y factores de transcripción E2F para los genes regulados a la baja, junto con marcas de histonas asociadas con la activación transcripcional (**Figura 49B**). Estos transcritos regulados a la baja están involucrados principalmente en el control del ciclo celular, el mantenimiento de los telómeros, la organización de los cromosomas y la reparación del ADN (**Figura 49C**). Además, si comparamos estos genes reprimidos con los reportados en estudios realizados en varias líneas celulares de cánceres humanos encontramos una superposición estadísticamente significativa general asociada al tratamiento con palbociclib (**Figura 49D**).

Los análisis de GSEA de las muestras tumorales respecto de las muestras tumorales tratadas con palbociclib y cisplatino, revelaron un enriquecimiento en genes diana de factores de transcripción como E2F, MYC, y en las vías de señalización relacionadas con el punto de control de ciclo celular G2/M y TEM en las muestras tumorales. Además, observamos una pérdida de enriquecimiento en los genes dependientes de la señalización de K-Ras en los tumores tratados y un aumento de enriquecimiento en genes regulados en vías de metabolismo de xenobióticos, de acuerdo con el metabolismo esperado de los fármacos antitumorales (**Figura 50**).

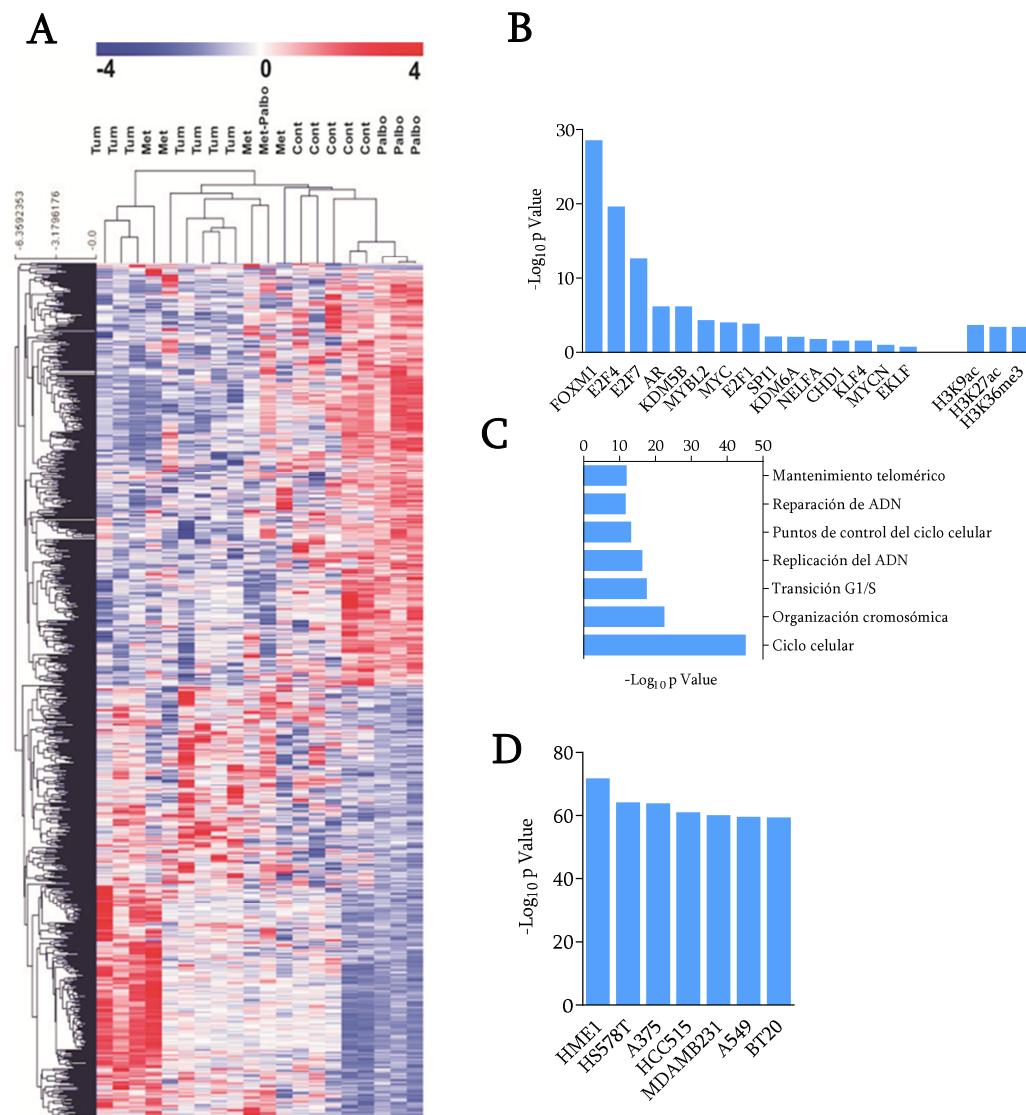


Figura 49. Análisis transcriptómico de tejido normal urotelial, tumores y metástasis tratados con el vehículo, y tumores y metástasis uroteliales tratados con la combinación de palbociclib y cisplatino en el modelo CKO. **A)** Esquema del agrupamiento jerárquico supervisado del transcriptoma en tejido urotelial normal (cont), tumores pertenecientes a ratones tratados con el vehículo (Tum), metástasis pertenecientes a ratones tratados con el vehículo (met), tumores extraídos de ratones tratados con la combinación de palbociclib y cisplatino (palbo) y metástasis pertenecientes a ratones tratados con palbociclib y cisplatino (met-palbo). **B)** En la gráfica se muestra el análisis de las marcas de histonas y los factores de transcripción que tienen sitios de unión a los genes con expresión reducida en los tumores tratados con la combinación de palbociclib con cisplatino respecto a los sin tratar usando el algoritmo Enrich webtool (<http://amp.pharm.mssm.edu/Enrichr/>)^{40,132}. **C)** En la gráfica se muestran los procesos biológicos más relevantes en los que están involucrados los genes reprimidos por el tratamiento con palbociclib y cisplatino identificados por un análisis de ontología génica. **D)** En la gráfica se muestra la superposición entre los genes reprimidos en tumores uroteliales tratados con palbociclib y cisplatino frente a genes identificados en estudios previos de tratamiento con palbociclib en líneas celulares de otros tipos de cáncer.

Tumor vs Tratamiento

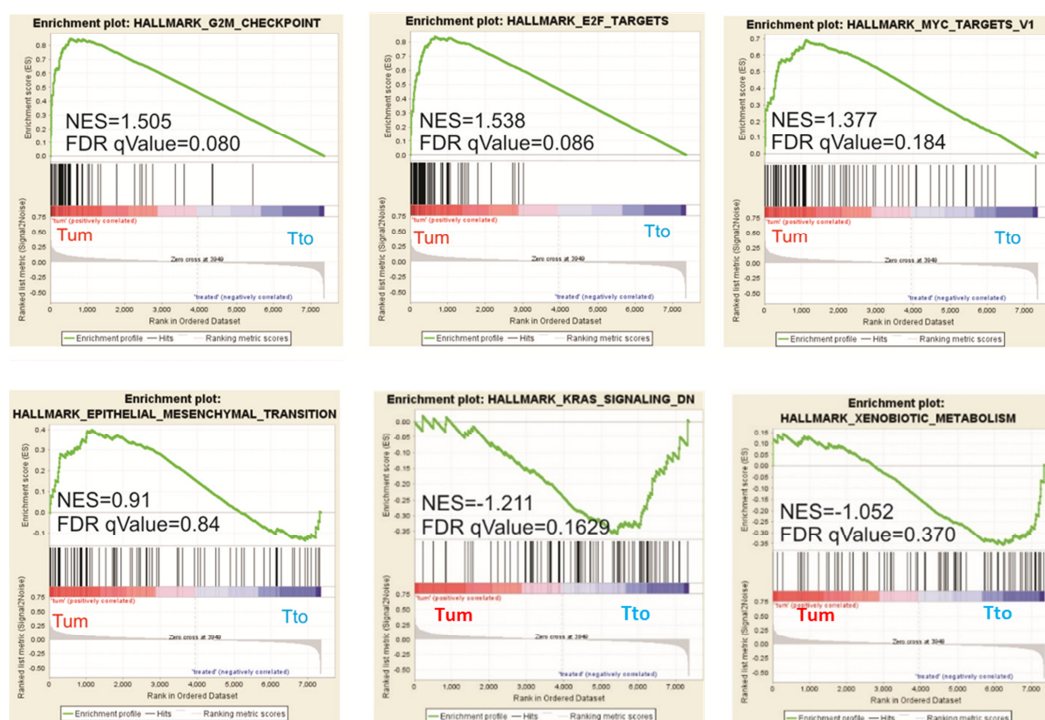


Figura 50. Análisis de enriquecimiento en grupos de genes (GSEA). En las gráficas se observa los análisis correspondientes a los tumores de ratones CKO tratados con el vehículo (Tum) vs tumores de ratones CKO tratados con el tratamiento palbociclib y cisplatino (Tto). FDR: “false discovery rate”; “NES: “normalized enrichment score”.

Estos resultados muestran que la supresión de los genes *Rb1*, *Pten*, *Trp53* y *Rbl1* en las células uroteliales basales (K5) del urotelio positivas para la queratina 5 da lugar a la generación de tumores de cáncer urotelial invasivo, produciendo a su vez un alto número de metástasis. Los tumores generados por este modelo de ratón mostraron un enriquecimiento en la expresión de genes involucrados en procesos biológicos relacionados con la aparición del cáncer, como el ciclo celular, remodelación de la cromatina y la reparación/replicación del ADN. Mostrando, por lo tanto, que es un buen modelo de cáncer urotelial invasivo. De forma relevante, los datos referentes a la actividad del inhibidor de CDK4/6 (palbociclib) junto con el quimioterápico cisplatino, muestran una disminución de la carga metastásica y un aumento de la supervivencia global en estos ratones. Los tumores con el doble

Resultados

tratamiento muestran una regulación de las vías oncogénicas, asemejándose a las muestras uroteliales control y probando así el efecto terapéutico del tratamiento. Por todo ello, estos resultados abren vías alternativas de tratamiento para los pacientes con cáncer de vejiga que no pueden ser tratados con cisplatino como agente único debido a su toxicidad. El empleo de inhibidores de CDK4/6, como el palbociclib, permitiría reducir de forma significativa la dosis de cisplatina empleada y, por lo tanto, supondría una posible nueva línea de tratamiento para pacientes con comorbilidades, los cuales actualmente carecen de un tratamiento efectivo.

DISCUSIÓN



Discusión

Como se ha mencionado en el primer capítulo de esta tesis, el tratamiento del CU ha tenido pocas mejoras desde la década de 1970. Para el CU avanzado la terapia basada en platino es la más empleada, pero aun así la supervivencia libre de enfermedad es muy baja, y a los dos años la mayoría de los pacientes mueren de enfermedad metastásica. Los inhibidores de punto de control inmunitario han mostrado una mejora en el tratamiento pero sólo un porcentaje reducido de pacientes, alrededor del 20-35%, han mostrado un beneficio claro de estas nuevas terapias ¹³³. Con este trabajo queremos presentar los fundamentos para formar la base hacia un nuevo enfoque terapéutico en el cáncer urotelial basado en el uso de un inhibidor de CDK4/6, palbociclib, en combinación con el quimioterápico cisplatino.

La estrategia racional para el empleo de inhibidores de CDK4 / 6 en el manejo de los pacientes oncológicos generalmente se asocia con un estado nativo del gen *RBI* ¹³⁴. El mecanismo de acción de estos inhibidores se basa en el bloqueo de la actividad de los complejos ciclina D-CDK4/6 que provoca la inactivación funcional de pRB y la consiguiente detención de la proliferación celular. Recientemente los inhibidores de CDK4/6 también han ganado relevancia clínica porque se ha demostrado que pueden mostrar sinergia con otros compuestos antitumorales y porque pueden superar la resistencia a las terapias actuales si se utilizan en combinación ¹³⁵.

1. Efecto de palbociclib en líneas de cáncer de vejiga.

Debido a que una de las características fundamentales del desarrollo tumoral se basa en una proliferación descontrolada, en los últimos años los esfuerzos se han centrado en dianas relacionadas con los procesos de regulación de la división celular, y un claro ejemplo de ello es el desarrollo de inhibidores de CDK's. En las últimas décadas se desarrollaron distintos inhibidores de CDK como posibles terapias contra

Discusión

el cáncer. Las primeras generaciones de inhibidores fueron inespecíficas y se les denomina pan-CDK, un ejemplo fue el flavopiridol ¹³⁶. Este pan-inhibidor produce detección del ciclo celular, pero tiene efectos citotóxicos como resultado de la inhibición de CDK7 y CDK9, ambas ciclinas relacionadas con la ARN polimerasa y el inicio de la transcripción, cuyas funciones necesarias para el inicio de la transcripción del ADN. A pesar del amplio espectro de inhibición del flavopiridol (CDK1, CDK2, CDK4, CDK6, CDK7 y CDK9), este no mostró un gran beneficio en los ensayos clínicos *in vivo* tipo Fase II sobre tumores sólidos ¹³⁷. Después de estos resultados la segunda generación de inhibidores de CDK se centró en la inhibición más específica y potente (permitiendo el empleo de dosis más bajas de dichos compuestos). Un ejemplo fue el dinaciclib, inhibidor específico de CDK1, CDK2, CDK5 y CDK9, con concentraciones inhibitorias entre 1-4 nM, en vez de los 20-100 nM de flavopiridol. En comparación con el flavopiridol este inhibidor mostró una actividad superior en la supresión de la fosforilación de pRB en los ensayos *in vitro* ¹³⁸. Los primeros ensayos clínicos fueron prometedores, sin embargo en estudios de Fase II, los resultados fueron desfavorables, ya que aunque la terapia con dinaciclib demostró cierta actividad antitumoral y fue generalmente tolerada, la eficacia del tratamiento no fue superior a la obtenida con el tratamiento de la capecitabina, el agente quimioterápico utilizado como tratamiento en cáncer de mama avanzado ¹³⁹.

A partir de estos inhibidores, los esfuerzos científicos han ido centrándose en una mejora de especificidad de los inhibidores de CDK y con ello una mayor comprensión del mecanismo de acción y la desregulación de las CDK's en el cáncer. Todos los hallazgos se fueron centrando por lo tanto en la inhibición de CDK4/6 debido a las características únicas que poseen estas dos proteínas. En primer lugar, su inhibición provocaría un efecto citostático en la fase G0/G1 del ciclo celular. En segundo lugar, su efecto directamente activaría la señalización de la vía de *RB1* y por lo tanto inhibiría la proliferación celular. Y en último lugar, ambos efectos son particularmente útiles ya que la actividad de CDK4/6 está desregulada en una amplia variedad de tumores ¹³⁷.

Por todas estas características los inhibidores de CDK4/6 han ido optimizándose hasta que, el hoy reconocido palbociclib (PD-0332991, Pzifer), demostró efectividad en la inhibición de proliferación celular en cultivos *in vitro* y en modelos de xenoinjertos ^{140,141}. Posteriormente, múltiples grupos han demostrado que los inhibidores de CDK4/6 detienen el ciclo celular a través del bloqueo de la fosforilación de pRB, p107 y p130 ¹⁴². A partir de esta observación, se originó la base racional de que la selección de pacientes para el tratamiento de palbociclib fuera un gen *RB1* wt, de manera que al inhibir CDK4/6 se detenga la proliferación en G1, impidiendo la fosforilación de pRB y por lo tanto bloqueando la progresión en el ciclo celular ¹³⁴. En contraste a todo lo anterior, nuestros resultados *in vitro* muestran que empleando seis líneas celulares de cáncer urotelial todas mostraron una sensibilidad similar, independientemente de la presencia de mutación en *RB1* y del tipo o grado del tumor del que fueron originadas. Sin embargo, en los ensayos de ciclo celular observamos que sí existen diferencias en la inhibición de CDK4/6, dependiente de si el gen *RB1* está wt o mutado. Las células *RB1* wt tratadas con palbociclib muestran una parada en ciclo celular en G1. Sin embargo, las células *RB1* mut muestran una parada de ciclo en fase G2, mostrando así que, aunque hay efecto en todas las líneas celulares, éste es diferente dependiendo de la presencia de mutación en *RB1*. Rivadeneira et al. han publicado que en el caso de células *RB1* mut de cáncer de hígado, la sensibilidad a palbociclib se debe al aumento de p107 como compensación por la pérdida de pRB ¹⁴³. Este mecanismo compensatorio ha sido publicado en algunos trabajos cuando existe una pérdida de pRB ¹³¹. Sin embargo, nuestros análisis mediante western blot no revelan un aumento compensatorio de p107 en las células con *RB1* mut, pero si un aumento moderado de p130, aunque sin cambios en p16. Curiosamente, en las células *RB1* wt si observamos un aumento de la expresión de p107, lo que nos indica un mecanismo de acción diferente a las células *RB1* mut. Este efecto puede ser similar al reportado como consecuencia de la inactivación génica permanente del gen *RB1* en ratón ^{131,144}.

Discusión

Además de producir una parada del ciclo celular, el tratamiento de palbociclib ocasionó muerte celular en las células *RB1* wt. Este resultado es concordante con publicaciones anteriores, en las que se muestra que la inhibición de las CDK's desencadena apoptosis celular además del arresto proliferativo en fase G1^{134,145}. Recientemente se ha demostrado que el tratamiento de palbociclib en líneas de leucemia linfoblástica aguda (LLA) promueve apoptosis de manera independiente de la familia pRB mediante la inhibición de los complejos CDK6-CiclinaD3. Este mecanismo independiente se debería a la inhibición de enzimas relacionadas con el metabolismo glucolítico, reduciendo así el glutatión y el NADPH (antioxidantes), y provocando un aumento de especies reactivas de oxígeno y causando la apoptosis¹⁴⁶. Si estos cambios se producen en nuestras células de vejiga, y cómo esto podría estar relacionado con el estado de RB1 aún no ha sido explorado. Sin embargo, en el análisis de GSEA de los tumores que han sido tratados con palbociclib y cisplatino muestra alteraciones metabólicas (datos no mostrados). Por todo ello, no podemos descartar que el metabolismo también sea participe de la diferente respuesta terapéutica que encontramos, y podría el punto de partida de investigaciones futuras.

2. FOXM1 actúa como diana de la inhibición de CDK4 /6.

Como hemos destacado, los distintos ensayos realizados nos indican un mecanismo de acción diferente entre las células *RB1* wt y las células *RB1* mut. El análisis de los genes regulados por el tratamiento con palbociclib nos corroboró estas diferencias. Sorprendentemente, los análisis bioinformáticos revelaron que los genes disminuidos por el tratamiento con palbociclib son, en su mayoría, regulados positivamente por el regulador transcripcional FOXM1, superando incluso a los factores E2F reconocidos por su importante efecto en la regulación del ciclo celular. FOXM1 es un activador transcripcional relacionado con múltiples funciones oncogénicas^{147,148} debido a que bajo su control se encuentran distintas actividades celulares como apoptosis, metástasis, angiogénesis, regeneración de tejido y reparación de daños en el ADN^{69,90,149}. Una de las actividades reguladoras de FOXM1

es el control del ciclo celular, la forma funcionalmente activa regula la expresión de las proteínas del ciclo celular que son esenciales para la fase G1 a S y la progresión de la fase G2 a M. FOXM1 regula la proliferación celular a través de una expresión controlada de factores inhibidores que reprimen la entrada de fase S y M, como p21^{Cip1} y p27^{Cip1}, y activando los activadores de CDK o las ciclinas, como CDK2-ciclina^{89,150}. En un estudio de proteómica para ver los sustratos de CDK4/6 se vio que FOXM1 es una diana directa de esta CDK, de manera que la fosforilación de CDK4/6 estabiliza y activa FOXM1⁶⁷. De acuerdo con este estudio, se observó que la fosforilación de FOXM1 está claramente reducida con el tratamiento de palbociclib y con el silenciamiento de CDK4 mediante el uso de lentivirus codificantes para shARNs. Además, esta reducción de los niveles de FOXM1 fosforilado es suficiente para producir inhibición en el crecimiento tumoral en los modelos *in vivo*, de forma independiente del estado del gen *RBI*. Análogamente, cuando aumentamos la expresión de la proteína FOXM1 observamos una mayor sensibilidad de palbociclib. Estos datos están en concordancia con un estudio realizado por Li y colaboradores en un metanálisis con 23 estudios identificados en PubMed y Medline. En el análisis se encontró que la expresión de FOXM1 está asociada a una peor supervivencia. También se vio que FOXM1 está relacionado con mal pronóstico en cáncer colorrectal, gástrico, hígado, pulmón y ovario y, como en nuestros análisis, el alto nivel de expresión de FOXM1 se asoció a un estadio tumoral avanzado, lo que muestra la relevancia de FOXM1 en el mantenimiento de las propiedades oncogénicas y su importancia como potencial diana terapéutica en tumores sólidos

149.

3. Importancia de FOXM1 en el cáncer de vejiga.

En vista de los datos obtenidos, y para poder considerar el uso de palbociclib como terapia futura en el cáncer urotelial, es necesario analizar si FOXM1 también podría ser relevante en dicha enfermedad. Nuestros resultados indican que en una serie de pacientes de CUNMI, los niveles de expresión de FOXM1 discriminan entre

Discusión

muestras normales, tumores primarios y tumores recurrentes. El aumento de la actividad, analizado mediante los niveles de la fosforilación del residuo Thr-600 por CDK4/6, y de la expresión de FOXM1, discriminan los tumores primarios de alto grado, con riesgo de recurrencia y aquellos tumores que mostraron progresión en la recurrencia. Estos resultados están en concordancia con otras investigaciones en las que se ha visto que FOXM1 está aumentado en las muestras de tejido tumoral de cáncer de vejiga en comparación con las muestras normales ¹⁵¹ y que puede tener un valor pronóstico de recurrencia ¹⁵². Además, utilizando los genes identificados previamente como dianas de FOXM1 ^{97,127} mediante ChIP-Seq pudimos diferenciar los diferentes subtipos del TCGA, mostrando que FOXM1 es un buen biomarcador para la estratificación de pacientes en los distintos subtipos de CU. Por otro lado, estudios recientes han demostrado que la inhibición de FOXM1 inhibe el crecimiento celular, la migración y la invasión en una variedad de tipos de tumores, incluidos los cánceres de páncreas y de mama, a través de la inhibición de factores involucrados en la angiogénesis y la degradación de la matriz extracelular, como el VEGF, MMP-2 y MMP-9 ^{85,153}. De hecho, se ha visto que el aumento de expresión de FOXM1 se asocia con un mal pronóstico en el cáncer de vejiga ¹⁴⁹. Pocos compuestos han mostrado actividad contra las funciones de FOXM1, sin embargo algunos estudios han demostrado que el antibiótico thiostrepton interactúa directamente sobre la proteína de FOXM1 en líneas celulares de cáncer de mama proporcionando una base molecular para utilizar FOXM1 como diana terapéutica ^{154,155}. De forma similar, en líneas celulares de carcinoma hepatocelular la inhibición de FOXM1 mediante un péptido ARF (del inglés, *alternative reading frame*) induce la apoptosis ^{156,157}.

Estas evidencias sugieren que la determinación de los niveles de FOXM1 podría ser empleado como biomarcador predictivo para la respuesta terapéutica al tratamiento con palbociclib, permitiendo una estratificación adecuada de los pacientes con cáncer de vejiga que podrían beneficiarse con este tipo de terapia.

4. Utilización de palbociclib junto con el quimioterápico cisplatino.

Una de las múltiples funciones que se ha demostrado que tiene FOXM1 en el cáncer es que confiere resistencia frente a varios agentes quimioterápicos ¹⁵⁸⁻¹⁶⁰. La quimioterapia basada en platino, como el cisplatino, se ha establecido durante mucho tiempo como el tratamiento de rutina de pacientes con cáncer de pulmón, cáncer de ovario, cáncer testicular y cáncer de vejiga ^{39,161}. En particular, en el tratamiento del cáncer de vejiga, un amplio porcentaje de los pacientes no cumplen los requerimientos de inclusión necesarios para ser tratados con las dosis actuales de esta quimioterapia por comorbilidades asociadas a la edad y a otras patologías (pacientes “*unfit*”). Encontrar una alternativa que permita una disminución de la dosis podría tener una gran importancia, ya que permitiría la inclusión de un mayor número de pacientes que se beneficiarían de la quimioterapia. En su conjunto, nuestros datos indican que la posible inhibición de FOXM1, mediada por el tratamiento con palbociclib, podría conferir una mayor sensibilidad a cisplatino en el cáncer de vejiga. Otro punto importante, a tener en cuenta en la utilización de inhibidores de CDK4/6, es que estos compuestos pueden ser utilizados en combinación con otras terapias, como por ejemplo el letrozol, un inhibidor de aromatasa ampliamente utilizado en el tratamiento de cáncer de mama hormono-sensible después de cirugía. Estas combinaciones aumentan las opciones terapéuticas y pueden ofrecer una nueva alternativa a la resistencia de tales tratamientos ^{135,162}. Nuestros experimentos *in vitro* sugieren que el tratamiento combinado de palbociclib y cisplatino permitiría el uso de dosis reducidas de cisplatino entre 20 y 500 veces. El uso de palbociclib en combinación con otros fármacos o quimioterápicos, y los beneficios de esta combinación han sido demostrados en una amplia variedad de trabajos ^{135,162}. Otros grupos, por ejemplo, Gao et al, 2017, encontraron que en las células derivadas de cáncer de ovario tratadas con palbociclib este produce efectos anti-proliferativos además de cooperar para inducir muerte celular con paclitaxel ¹⁶³. Sin embargo, la eficacia de los distintos agentes quimioterápicos depende de en qué punto del ciclo celular se produce la parada. Esto puede generar efectos antagónicos, aditivos o

Discusión

sinérgicos con los inhibidores de CDK4/6. En nuestra investigación hemos observado que la combinación de palbociclib y cisplatino tiene un efecto sinérgico en todas las líneas celulares. En la búsqueda de mecanismos de acción subyacentes a estos efectos combinatorios observados encontramos algunos aspectos interesantes. Vimos que si aumentamos la expresión de FOXM1 en las líneas celulares aumentamos la resistencia a cisplatino y la sensibilidad a palbociclib. Por otro lado, si disminuimos la expresión de CDK4 en las líneas tumorales vemos que no afecta a las dosis de cisplatino y sin embargo, produce resistencia al tratamiento con palbociclib. Estos resultados respaldarían nuestra hipótesis de que FOXM1 está relacionado con resistencia a cisplatino y es una diana del tratamiento de palbociclib en cáncer de vejiga. Para aclarar el papel de FOXM1 se decidió utilizar células con una expresión aumentada y disminuida de FOXM1 en ensayos combinados con los dos fármacos, en este experimento vimos que la presencia y ausencia de FOXM1 en general no afecta en la sinergia que muestran los dos fármacos unidos. Por lo contrario, otro grupo de investigación destaca que la inhibición de CDK4/6 antagonizan con el efecto apoptótico de las terapias citotóxicas en líneas de cáncer mamario ¹⁶⁴. Curiosamente, esta combinación también produjo efectos antagónicos sobre el crecimiento celular del adenocarcinoma ductal pancreático ¹⁶⁵. La combinación de inhibición de CDK4 / 6 con quimioterapia con carboplatino o paclitaxel en células de cáncer de ovario mostró interacciones aditivas o sinérgicas cuando se utilizaron concomitantemente, mientras que el tratamiento de las células con inhibidores de CDK4/6 24 horas antes de la quimioterapia causó un efecto antagónico ¹⁶⁶. En los ensayos *in vivo* del tratamiento combinado de palbociclib con cisplatino utilizando xenoinjertos de las células tumorales en ratones inmunodeficientes, corroboramos esta sinergia y observamos una regresión tumoral, que en los tratamientos de cisplatino como único agente terapéutico no se obtuvo. De manera análoga, existen varias publicaciones científicas que apoyan nuestros resultados sobre la relevancia de niveles de FOXM1 en la resistencia y sensibilidad al cisplatino en cáncer de mama ¹⁵⁹, cáncer gástrico ¹⁶⁷ y en cáncer de pulmón no microcítico ¹⁵⁸, cáncer de ovario ¹⁶⁸.

Debido a que la actividad de la quimioterapia generalmente requiere la progresión del ciclo celular, la combinación o administración secuencial de esta clase de medicamentos con inhibidores de CDK4/6 puede ser importante para lograr la sinergia y evitar el posible antagonismo. Aunque los estudios sobre FOXM1 en el cáncer de vejiga humano son todavía escasos, en conjunto, estas observaciones respaldan claramente la posibilidad de que el palbociclib solo o en combinación con otras terapias pueda ser una herramienta relevante para el tratamiento clínico del cáncer de vejiga.

5. Empleo de palbociclib en combinación con cisplatino en un modelo de ratón de cáncer de vejiga metastásico inmunocompetente.

Los ratones transgénicos son herramientas que permiten expresar o suprimir determinados genes en tejidos concretos y analizar cómo estas modificaciones afectan a los mecanismos moleculares que tienen lugar durante la carcinogénesis. En este trabajo hemos considerado una aproximación de estudio basada en la recombinación tejido específica e inducible.

Los miembros de la familia de genes de retinoblastoma han sido descritos como moduladores esenciales en la progresión del ciclo celular ¹⁶⁹. Para considerar completamente la actividad independiente de *RBI* en el tratamiento con palbociclib, hemos generado ratones eliminando el gen *RBI* (pRB), en un fondo genético con *RBL1* (p107) nulo. Este último para evitar posibles mecanismos compensatorios entre p107 y pRB ^{131,170}.

Las mutaciones de *TP53* o *PTEN* se encuentran entre los eventos causales más frecuentes en muchos cánceres, y su inactivación combinada tiene profundas consecuencias para la tumorigénesis en numerosos contextos, incluyendo linfoma ¹⁷¹, cáncer de próstata¹⁷², glioblastoma ¹⁷³ y meduloblastoma ¹⁷⁴. Estudios anteriores del grupo indicaron que las funciones de *PTEN* como supresor tumoral se relacionan con la regulación del ciclo celular llevada a cabo por pRB y p107 ¹⁷⁵. Las mutaciones en el

Discusión

gen *TP53* se relacionan con un mayor potencial metastásico de los tumores humanos. De hecho, trabajos realizados en nuestro grupo han demostrado que los modelos deficientes en p53 o pRB y p53 comparten ciertas propiedades con distintos tumores humanos que se caracterizan por un peor pronóstico y una mayor incidencia de metástasis ¹⁷⁶. De hecho, el principal papel de p53 en el cáncer de vejiga invasivo está bien establecido ^{177,178}. En 2009, Puzio-Kuter identificó que en el cáncer de vejiga tanto humanos como en modelos murinos la pérdida de la función simultánea de *PTEN* y *p53* tiene consecuencias perjudiciales y permite identificar un subgrupo de pacientes con enfermedad particularmente agresiva. En el modelo murino además, la eliminación combinada de *p53* y *PTEN* en el urotelio vesical produce tumores invasivos ¹¹⁷.

Con el fin de caracterizar mejor este modelo transgénico los tumores y metástasis obtenidas del modelo múrido se compararon frente a urotelio normal en un análisis transcriptómico, mostrando un patrón similar al subtipo humanos de CU basal escamoso, y un patrón opuesto a los subtipos humanos de CU luminal papilar y luminal. Además, en base a la reducción de *PTEN* y al aumento de actividad de *AKT*, *ERK*, *S6* y *STAT3*, verificamos frente a muestras proteómicas de TCGA, que estas características se encuentran un grupo específico de CU, enriquecido sobre todo en los subtipos basal-escamoso, luminal infiltrado y neuronal. Este mismo grupo tumoral se caracteriza por la presencia simultáneamente de mutaciones en *TP53* y *RBI*, mayor número de metástasis y una menor supervivencia de los pacientes. Todos estos resultados en conjunto demostrarían que el modelo de raton CKO representa fielmente un modelo de cáncer de vejiga humano, y por lo tanto es una buena herramienta para los estudios *in vivo* pre-clínicos.

Para estudiar el efecto del palbociclib en un contexto más fisiológico que los estudios *in vitro* empleamos un modelo condicional utilizando adenovirus codificantes para la Cre-recombinasa, que al utilizar el promotor de la queratina 5 ¹¹⁶ permite la delección del gen en interés en células basales uroteliales. La aplicación tópica del adenovirus en la luz de la vejiga produce la recombinación esperada de las

secuencias loxP y, en consecuencia, la delección de los genes de interés *Rb1*, *Pten* y *Trp53* en un fondo genético con *Rbl2* (p107) nulo creando así un modelo con una delección cuádruple. Los tumores uroteliales invasivos surgen a partir de la combinación de múltiples alteraciones genómicas simultáneas, entre las que se destacan las de los genes *TP53*, *RB1* y *PTEN*. Durante décadas, los defectos combinados de pRb / p53 han sido casi sinónimos de carcinomas uroteliales invasivos de músculo, en gran parte debido a la correlación clínica entre los dos. Aproximadamente el 50% de los carcinomas uroteliales invasivos albergan mutaciones de p53 y expresión aberrante de pRb simultáneamente, y estas dos alteraciones se asocian más significativamente con un pronóstico desfavorable y la supervivencia del paciente que una sola alteración ¹⁷⁹. Mientras que las mutaciones inactivadoras de *RB1* son raras, la reducción o pérdida de la expresión de *RB1* representa el 40–50% de los carcinomas invasivos, y está fuertemente asociada con un resultado clínico deficiente. Todas las proteínas de la familia pRb, incluida la propia pRb, p107 y p130, se expresan de manera uniforme en todas las capas uroteliales. Parece, por lo tanto, que las proteínas de la familia pRb desempeñan un papel redundante en la prevención de la progresión del ciclo celular urotelial, manteniendo así su crecimiento y proliferación al mínimo. Si este fuera el caso, entonces se podría predecir que la anulación de uno de los miembros de la familia pRb no sería suficiente para acelerar el crecimiento urotelial o la tumorigénesis y que la deficiencia de un miembro podría incluso conducir a una inducción compensatoria de otro. Cuando se eliminó pRb en las celulares uroteliales de ratones mediante el sistema Cre-LoxP se observó una inducción de p107 (*Rbl1*) ¹⁸⁰. Los tumores de vejiga que tienen anomalías adquiridas dentro de la vía PI3K/AKT se asocian con un fenotipo más agresivo y tasas de supervivencia bajas. Además, la pérdida de PTEN se ha asociado con el aumento de grado y estadio de los tumores papilares ¹¹⁷. Nuestros resultados demuestran que efectivamente la supresión de estos cuatro genes (*Rb1*, *Pten*, *Trp53*, *Rbl1*) en las células basales de la vejiga produce tumores en un período de 90-120 días. Estos tumores invaden la capa muscular de la

Discusión

vejiga y muestran un gran potencial metastásico, llegando a órganos distales como el hígado, el pulmón y la cavidad peritoneal. Esta capacidad metastásica también se observa en los tumores de vejiga avanzados humanos ^{117,181}. La caracterización del transcriptoma completo de los tumores primarios y sus metástasis en comparación con el tejido de vejiga control (obtenido de vejigas de ratones hermanos no inoculados con el adenovirus) por GSEA mostró un aumento de la expresión de los genes diana de factores de transcripción E2F y MYC, la inducción una transición epitelio-mesénquima, y en las vías de señalización relacionadas con el punto de control de ciclo celular G2/M. Todas estas vías de señalización también han sido reportados en la carcinogénesis humana del cáncer de vejiga ¹⁸².

Por otra parte, cuando realizamos análisis de ontología génica empleando una herramienta web (Gene Set Enrichment Analysis) que permite explorar si los genes expresados diferencialmente están asociados con un determinado proceso biológico o función molecular, encontramos una inducción significativa de genes involucrados en ciclo celular, reparación/replicación del ADN y genes involucrados en la remodelación de la cromatina, principalmente unidos a los factores de transcripción E2F, MYC, y muy notablemente a FOXM1. Los genes que se encontraron disminuidos en esta comparativa estaban principalmente involucrados en la señalización de VEGF, la regulación negativa de la señalización intracelular y la organización de la matriz extracelular, y estaban relacionados con reguladores transcripcionales, incluidos los miembros de Polycomb. Esto último está acorde con hallazgos previos de nuestro grupo que, en trabajos publicados anteriormente, hemos demostrado las actividades oncogénicas de EZH2 y/o BMI que al reprimir la expresión de los miembros de la familia miR-200 conduce a la posterior regulación de los factores de transcripción que promueven la EMT (ZEB1 y ZEB2) y favorece el comportamiento invasivo de las células tumorales y la progresión en tumores invasivos uroteliales ¹⁸³. Finalmente, observamos una superposición significativa de los genes desregulados en este modelo murino con genes desregulados contenidos en varios repositorios de datos transcriptómicos de tumores humanos infiltrantes de

vejiga (base de datos de Oncomine), que también tienen un mal pronóstico clínico y mutaciones en el gen *RB1*.

Partiendo de este modelo en el cual presenta similitud con tumores humanos exploramos la eficacia del tratamiento combinado de palbociclib y cisplatino. Al igual que observamos en las líneas celulares derivadas de tumores humanos, el tratamiento combinado resultó muy eficiente como terapia antitumoral, produciendo una disminución del crecimiento tumoral y una reversión de patrones genéticos característicos de células tumorales tales como un aumento de marcadores de apoptosis (caspasa-3 activada) y la disminución de marcadores relacionados con la proliferación tumoral como pH3 y la BrdU. Los análisis transcriptómicos de los tumores de ratón tratados mostraron que además de la reducción de FOXM1 también hay una expresión reducida de EZH2. Este dato no es trivial, ya que el aumento de expresión de las proteínas pertenecientes al complejo de represión Polycomb 2 (PCR2), como EZH2, es una característica común de varios tumores humanos, incluido el cáncer urotelial, y está involucrada en el desarrollo y la progresión de estos tumores ¹⁸⁰. La disminución de EZH2 puede deberse a la represión de algunos factores E2Fs activadores, como el E2F3a con el tratamiento. En particular E2F3a ha sido reportado repetidamente como el principal regulador de EZH2 en cáncer de vejiga ^{118,184,185}. Finalmente, en los tumores con el doble tratamiento se puede ver un infiltrado linfocitario, siendo un claro ejemplo de respuesta inmune. Esto se ha visto también en tumores de mama posterior al tratamiento con inhibidores de CDK4/6 y se ha asociado a una respuesta inmune antitumoral ^{186,187}. Particularmente en cáncer de vejiga, como se ha mencionado antes, en los últimos 30 años las opciones de tratamiento no había tenido muchas mejoras hasta que en los últimos años se han aprobado varios ensayos clínicos con terapias de inhibidores de puntos de control inmune ¹⁸⁸. Por este motivo, una posible investigación futura sería caracterizar este infiltrado inmune, para poder examinar si el efecto de palbociclib, solo o en combinación con cisplatino, conferiría una mayor

Discusión

sensibilidad a estas inmunoterapias y de esta manera lograr que un mayor número de pacientes se puedan beneficiar de este tipo de terapias combinadas.

Todos los hallazgos expuestos en este trabajo representan la base racional para posibles ensayos clínicos en pacientes con cáncer de vejiga, apoyando la eficacia de palbociclib, solo o en combinación con otras terapias. Además, nuestro estudio destaca el valor de integrar los análisis de un modelo de ratón relevante con datos de líneas celulares y tumorales humanos correlativos y funcionales para delinear vías de tumorigénesis, identificar objetivos racionales para la intervención terapéutica y evaluar la eficacia de dichos objetivos en estudios preclínicos. Aunque los estudios sobre FOXM1 en el cáncer de vejiga humano son todavía escasos, en conjunto, estas observaciones respaldan claramente la posibilidad de utilizar este gen como biomarcador de progresión y recurrencia en el cáncer de vejiga.

CONCLUSIONES



Conclusiones

- I. La sensibilidad a la inhibición de CDK4/6 por el inhibidor palbociclib en líneas de CU es independiente de la presencia de mutaciones en el gen *RBI* tanto *in vitro* como *in vivo*. No obstante, el efecto en el ciclo celular es diferente entre las células *RBI* mutantes o *wt*.
- II. Parte de los efectos de palbociclib se deben a la inhibición de la fosforilación del factor de transcripción FOXM1. La expresión de la forma fosforilada Thr600 de FOXM1 es un marcador de mal comportamiento clínico en cáncer urotelial, y podría ser utilizado como predictor de recurrencia temprana, y de respuesta a palbociclib.
- III. La administración combinada de palbociclib con cisplatino muestra un efecto sinérgico tanto *in vitro* como *in vivo*. Esta sinergia es mediada parcialmente por la expresión de FOXM1.
- IV. La eliminación simultánea de los genes codificantes para p107, pRB, p53 y PTEN en las células basales del urotelio, produce el desarrollo de tumores de cáncer de urotelial invasivo y metastásico.
- V. El tratamiento combinado empleando palbociclib y cisplatino de los ratones del modelo transgénico conduce a una disminución de la carga metastásica y un aumento de la supervivencia global de los animales.
- VI. El tratamiento combinado de palbociclib más cisplatino en los ratones CKO produce una reducción de la activación de vías oncogénicas determinadas, y un aumento del infiltrado linfocitario en los tumores.

REFERENCIAS



Referencias

1. Curtius, K., Wright, N. A. & Graham, T. A. An evolutionary perspective on field cancerization. *Nat. Rev. Cancer* **18**, 19–32 (2017).
2. SEOM. Las cifras del cáncer en España 2018. *Depos. Leg. _M-3461-2018*
3. Siegel, R. L., Miller, K. D. & Jemal, A. Cancer statistics, 2018. *CA. Cancer J. Clin.* **68**, 7–30 (2018).
4. Instituto Nacional de Estadística. Defunciones según la Causa de Muerte Año 2016. *Inst. Nac. Estadística* (2017).
5. Bray, F. *et al.* Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA. Cancer J. Clin.* **68**, 394–424 (2018).
6. Antoni, S. *et al.* Bladder Cancer Incidence and Mortality: A Global Overview and Recent Trends. *Eur. Urol.* **71**, 96–108 (2017).
7. Wong, M. C. S. *et al.* The global epidemiology of bladder cancer: a joinpoint regression analysis of its incidence and mortality trends and projection. *Sci. Rep.* **8**, 1129 (2018).
8. Sociedad española de oncología médica. Las cifras del cáncer en España 2019. *Redecan, Glob. cancer Obs.* **19**, 1–13 (2019).
9. Dobruch, J. *et al.* Gender and Bladder Cancer: A Collaborative Review of Etiology, Biology, and Outcomes. (2016). doi:10.1016/j.eururo.2015.08.037
10. Letašiová, S. *et al.* Bladder cancer, a review of the environmental risk factors. (2012). doi:10.1186/1476-069X-11-S1-S11
11. Tan, W. S. & Tan, W. P. Urinary biomarker for the detection of recurrence following non-muscle invasive bladder cancer: are we there yet? *Transl.*

Referencias

- Androl. Urol.* **7**, S109–S110 (2018).
12. Babjuk, M. *et al.* EAU Guidelines on Non–Muscle-invasive Urothelial Carcinoma of the Bladder: Update 2016. *Eur. Urol.* **71**, 447–461 (2017).
 13. Felsenstein, K. M. & Theodorescu, D. Precision medicine for urothelial bladder cancer: update on tumour genomics and immunotherapy. *Nat. Rev. Urol.* (2017). doi:10.1038/nrurol.2017.179
 14. Milojevic, B., Dzamic, Z., Kajmakovic, B., Milenkovic Petronic, D. & Sipetic Grujicic, S. Urothelial carcinoma: Recurrence and risk factors. *J. BUON.* **20**, 391–398 (2015).
 15. Vlachostergios, P. J. & Faltas, B. M. Treatment resistance in urothelial carcinoma: an evolutionary perspective. *Nat. Rev. Clin. Oncol.* (2018). doi:10.1038/s41571-018-0026-y
 16. Robertson, A. G. *et al.* Comprehensive Molecular Characterization of Muscle-Invasive Bladder Cancer. *Cell* (2017). doi:10.1016/j.cell.2017.09.007
 17. Humphrey, P. A., Moch, H. J., Cubilla, A. L., Ulbright, T. M. & Reuter, V. E. The 2016 WHO Classification of Tumours of the Urinary System and Male Genital Organs-Part B: Prostate and Bladder Tumours. *Eur. Urol.* 1–14 (2016).
 18. Kobayashi, T., Owczarek, T. B., McKiernan, J. M. & Abate-Shen, C. Modelling bladder cancer in mice: opportunities and challenges. *Nat. Rev. Cancer* **15**, 42–54 (2015).
 19. Sanli, O. *et al.* Bladder cancer. *Nat. Rev. Dis. Prim.* **3**, 1–19 (2017).
 20. Knowles, M. A. & Hurst, C. D. Molecular biology of bladder cancer: new insights into pathogenesis and clinical diversity. *Nat. Publ. Gr.* **15**, 25–41 (2015).
 21. Kiemeny, L. A. L. M., Witjes, J. A., Heijbroek, R. P., Debruyne, F. M. J. &

- Verbeek, A. L. M. Dysplasia in normal-looking urothelium increases the risk of tumour progression in primary superficial bladder cancer. *Eur. J. Cancer* **30**, 1621–1625 (1994).
22. Kurth, K.-H. & Sylvester, R. J. Prognostic Factors in Non-Muscle-Invasive Bladder Tumors I. Clinical Prognostic Factors: A Review of the Experience of the EORTC Genito-Urinary Group II. Biologic Prognostic Markers. doi:10.1016/j.eursup.2007.05.003
23. Bertz, S., Eckstein, M., Stoehr, R., Weyerer, V. & Hartmann, A. Urothelial Bladder Cancer: An Update on Molecular Pathology with Clinical Implications. (2017). doi:10.1016/j.eursup.2017.10.003
24. Compérat, E. M. *et al.* Grading of Urothelial Carcinoma and The New ‘World Health Organisation Classification of Tumours of the Urinary System and Male Genital Organs 2016’ (2018). doi:10.1016/j
25. Compérat, E., Varinot, J., Moroch, J., Eymerit-Morin, C. & Brimo, F. A practical guide to bladder cancer pathology. *Nat. Rev. Urol.* **15**, 143–154 (2018).
26. Griffiths, T. R. L. Current perspectives in bladder cancer management. *Int. J. Clin. Pract.* **67**, 435–448 (2013).
27. Burger, M. *et al.* ICUD-EAU international consultation on bladder cancer 2012: Non-muscle-invasive urothelial carcinoma of the bladder. *European Urology* **63**, 36–44 (2013).
28. Cheung, G., Sahai, A., Billia, M., Dasgupta, P. & Khan, M. S. Recent advances in the diagnosis and treatment of bladder cancer. *BMC Med.* **11**, 13 (2013).
29. Redelman-Sidi, G., Glickman, M. S. & Bochner, B. H. The mechanism of action of BCG therapy for bladder cancer—a current perspective. *Nat. Rev. Urol.* **11**, 153–162 (2014).

Referencias

30. Volpe, A. *et al.* Mitomycin C for the treatment of bladder cáncer. *Minerva Urol. Nefrol.* **62**, 133–44 (2010).
31. Daniel J. Lee, MDSam S. Chang, M. Cost considerations in the management of bladder cáncer | Urology Times. Available at: <http://www.urologytimes.com/bladder-cáncer/cost-considerations-management-bladder-cáncer>. (Accessed: 25th October 2018)
32. M. Babjuk (Chair), A. Böhle, M. Burger, E. Compérat, E. Kaasinen, J. Palou, M. Rouprêt, B.W.G. van Rhijn, S.F. Shariat, R. Sylvester, R. Z. & Guidelines Associates: O. Capoun, D. Cohen, V. Hernández, V. S. EAU Guidelines on Non-muscle-invasive Bladder Cáncer (Ta, T1 and CIS). *Eur. Assoc. Urol.* **2016** **71**, 447–461 (2017).
33. Van Rhijn, B. W. G. *et al.* Recurrence and Progression of Disease in Non–Muscle-Invasive Bladder Cáncer: From Epidemiology to Treatment Strategy. doi:10.1016/j.eururo.2009.06.028
34. Mariotto, A. B., Yabroff, K. R., Shao, Y., Feuer, E. J. & Brown, M. L. Projections of the cost of cáncer care in the United States: 2010–2020. *J. Natl. Cáncer Inst.* **103**, 117–28 (2011).
35. Leal, J., Luengo-Fernandez, R., Sullivan, R. & Witjes, J. A. Economic Burden of Bladder Cáncer Across the European Union. *Eur. Urol.* **69**, 438–447 (2016).
36. National Collaborating Centre for Cáncer (UK). Bladder Cáncer: Diagnosis and Management. *NICE Guidel.* **2**, (2015).
37. Prasad, S. M., DeCastro, G. J., Steinberg, G. D. & Medscape. Urothelial carcinoma of the bladder: definition, treatment and future efforts. *Nat. Rev. Urol.* **8**, 631–642 (2011).
38. Gallagher, D. J. & Milowsky, M. I. Bladder cáncer. *Curr. Treat. Options Oncol.* **10**, 205–215 (2009).

39. Witjes, J. A. *et al.* EAU Guidelines on Muscle-invasive and Metastatic Bladder Cáncer: Summary of the 2013 Guidelines. *Eur. Urol.* **65**, 778–792 (2014).
40. Bellmunt, J. *et al.* Pembrolizumab as Second-Line Therapy for Advanced Urothelial Carcinoma. *N. Engl. J. Med.* (2017). doi:10.1056/NEJMoa1613683
41. Plimack, E. R. *et al.* Safety and activity of pembrolizumab in patients with locally advanced or metastatic urothelial cáncer (KEYNOTE-012): a non-randomised, open-label, phase 1b study. *Lancet Oncol.* **18**, 212–220 (2017).
42. Lobo, N. *et al.* Landmarks in the treatment of muscle-invasive bladder cáncer. *Nat. Rev. Urol.* **14**, 565–574 (2017).
43. Mertens, L. S., Neuzillet, Y., Horenblas, S. & van Rhijn, B. W. G. Landmarks in non-muscle-invasive bladder cáncer. *Nat. Rev. Urol.* **11**, 476–80 (2014).
44. Otto, T. & Sicinski, P. Cell cycle proteins as promising targets in cáncer therapy. (2017). doi:10.1038/nrc.2016.138
45. Agami, R. & Bernards, R. Convergence of mitogenic and DNA damage signaling in the G1 phase of the cell cycle. *Cáncer Lett.* **177**, 111–8 (2002).
46. Vermeulen, K., Van Bockstaele, D. R., Berneman, Z. N., Vermeulen, K., Van Bockstaele, D. R. & Berneman, Z. N. The cell cycle: a review of regulation, deregulation and therapeutic targets in cáncer. *Cell Prolif.* **36**, 131–149 (2003).
47. Viallard, J. F., Lacombe, F., Belloc, F., Pellegrin, J. L. & Reiffers, J. [Molecular mechanisms controlling the cell cycle: fundamental aspects and implications for oncology]. *Cáncer Radiother.* **5**, 109–29 (2001).
48. Harashima, H., Dissmeyer, N. & Schnittger, A. Cell cycle control across the eukaryotic kingdom. *Trends Cell Biol.* **23**, 345–356 (2013).
49. Sherr, C. J. & Bartek, J. Cell Cycle–Targeted Cáncer Therapies. *Annu. Rev.*

Referencias

- Cáncer Biol.* **1**, 41–57 (2017).
50. Ingham, M. & Schwartz, G. K. Cell-cycle therapeutics come of age. *J. Clin. Oncol.* **35**, 2949–2959 (2017).
51. Dyson, N. J. RB1: a prototype tumor suppressor and an enigma. *Genes Dev.* **30**, 1492–502 (2016).
52. Malumbres, M. Cyclin-dependent kinases. *Genome Biol.* **15**, 122 (2014).
53. Hochegger, H., Takeda, S. & Hunt, T. Cyclin-dependent kinases and cell-cycle transitions: does one fit all? *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **9**, 910–916 (2008).
54. Bardin, A. J. & Amon, A. MEN and SIN: what's the difference? *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2**, 815–826 (2001).
55. Marcos Malumbres* and Mariano Barbacid†. Cell cycle, CDKs and cáncer: a changing paradigm. doi:10.1038/nrc2602
56. Lim, S. & Kaldis, P. Cdks, cyclins and CKIs: roles beyond cell cycle regulation. *Development* (2013). doi:10.1242/dev.091744
57. Stacey J. Baker, and E. P. R. CDK4: A Key Player in the Cell Cycle, Development, and Cáncer. doi:10.1177/1947601913478972
58. Sherr, C. J., Beach, D. & Shapiro, G. I. Targeting CDK4 and CDK6: From discovery to therapy. *Cáncer Discovery* (2016). doi:10.1158/2159-8290.CD-15-0894
59. Luo, R. X., Postigo, A. A. & Dean, D. C. Rb Interacts with Histone Deacetylase to Repress Transcription. *Cell* **92**, 463–473 (1998).
60. Zhao, R., Choi, B. Y., Lee, M.-H., Bode, A. M. & Dong, Z. Implications of Genetic and Epigenetic Alterations of CDKN2A (p16^{INK4a}) in Cáncer. *EBioMedicine* **8**, 30–39 (2016).

61. Pippa, R. *et al.* p27Kip1 represses transcription by direct interaction with p130/E2F4 at the promoters of target genes. *Oncogene* **31**, 4207–4220 (2012).
62. Blain, S. Switching cyclin D-Cdk4 kinase activity on and off. *Cell Cycle* **7**, 892–898 (2008).
63. Ray, A., James, M. K., Larochelle, S., Fisher, R. P. & Blain, S. W. p27Kip1 inhibits cyclin D-cyclin-dependent kinase 4 by two independent modes. *Mol. Cell. Biol.* **29**, 986–99 (2009).
64. He, G. *et al.* Induction of p21 by p53 following DNA damage inhibits both Cdk4 and Cdk2 activities. *Oncogene* **24**, 2929–2943 (2005).
65. Cobrinik, D. Pocket proteins and cell cycle control. *Oncogene* **24**, 2796–2809 (2005).
66. Granä, X., Garriga, J. & Mayol, X. *Role of the retinoblastoma protein family, pRB, p107 and p130 in the negative control of cell growth.*
67. Anders, L. *et al.* A systematic screen for CDK4/6 substrates links FOXM1 phosphorylation to senescence suppression in cancer cells. *Cancer Cell* **20**, 620–34 (2011).
68. Myatt, S. S. & Lam, E. W.-F. The emerging roles of forkhead box (Fox) proteins in cancer. *Nat. Rev. Cancer* **7**, 847–859 (2007).
69. Jaiswal, N., Chakraborty, S. & Nag, A. Biology of foxm1 and its emerging role in cancer therapy. *J. Proteins Proteomics* **5**, 1–24 (2014).
70. Wierstra, I. *The transcription factor FOXM1 (Forkhead box M1): Proliferation-specific expression, transcription factor function, target genes, mouse models, and normal biological roles. Advances in Cancer Research* **118**, (Copyright © 2013 Elsevier Inc. All rights reserved., 2013).
71. Burkhart, D. L. & Sage, J. Cellular mechanisms of tumour suppression by the

Referencias

- retinoblastoma gene. doi:10.1038/nrc2399
72. Rubin, S. M. Deciphering the retinoblastoma protein phosphorylation code. *Trends Biochem. Sci.* **38**, 12–9 (2013).
 73. Hamilton, E. & Infante, J. R. Targeting CDK4/6 in patients with cáncer. *Cáncer Treat. Rev.* **45**, 129–138 (2016).
 74. Domínguez, V., Andrés, R. & Navarro, G. EPIDEMIOLOGÍA DESCRIPTIVA Y ANÁLISIS DE SUPERVIVENCIA DEL CÁNCER DE VEJIGA EN HOSPITALES PÚBLICOS DE MADRID. (2009).
 75. Hanahan, D. & Weinberg, R. A. Hallmarks of cáncer: The next generation. *Cell* **144**, 646–674 (2011).
 76. Ortega, S., Malumbres, M. & Barbacid, M. Cyclin D-dependent kinases, INK4 inhibitors and cáncer. *Biochim. Biophys. Acta* **1602**, 73–87 (2002).
 77. Beroukhi, R. *et al.* The landscape of somatic copy-number alteration across human cáncers. *Nature* **463**, 899–905 (2010).
 78. Deshpande, A., Sicinski, P. & Hinds, P. W. Cyclins and cdks in development and cáncer: a perspective. *Oncogene* **24**, 2909–2915 (2005).
 79. Kim, J. K. & Diehl, J. A. Nuclear cyclin D1: an oncogenic driver in human cáncer. *J. Cell. Physiol.* **220**, 292–6 (2009).
 80. Goebell, P. J. & Knowles, M. A. Bladder cáncer or bladder cáncers? Genetically distinct malignant conditions of the urothelium. *Urol. Oncol. Semin. Orig. Investig.* **28**, 409–428 (2010).
 81. Pan, Q. *et al.* CDK4/6 Inhibitors in Cáncer Therapy: A Novel Treatment Strategy for Bladder Cáncer. *Bl. cáncer (Amsterdam, Netherlands)* **3**, 79–88 (2017).
 82. Rinaldetti, S. *et al.* FOXM1 predicts disease progression in non-muscle

- invasive bladder cancer. *J. Cáncer Res. Clin. Oncol.* **144**, 1701–1709 (2018).
83. Lu, X.-F. *et al.* FoxM1 is a promising candidate target in the treatment of breast cancer. *Oncotarget* **9**, 842 (2018).
84. Chen, Y. *et al.* FoxM1 overexpression promotes cell proliferation and migration and inhibits apoptosis in hypopharyngeal squamous cell carcinoma resulting in poor clinical prognosis. *Int. J. Oncol.* **51**, 1045–1054 (2017).
85. Huang, C., Du, J. & Xie, K. FOXM1 and its oncogenic signaling in pancreatic cancer pathogenesis. *Biochim. Biophys. Acta* **1845**, 104–16 (2014).
86. Wang, H. & Huang, C. FOXM1 and its Oncogenic Signaling in Gastric Cancer. *Recent Pat. Anticancer. Drug Discov.* **10**, 270–9 (2015).
87. Zhang, J. *et al.* FoxM1: a novel tumor biomarker of lung cancer. *Int. J. Clin. Exp. Med.* **8**, 3136–40 (2015).
88. He, S. *et al.* FOXM1 promotes tumor cell invasion and correlates with poor prognosis in early-stage cervical cancer. *Gynecol. Oncol.* **127**, 601–610 (2012).
89. Laoukili, J., Stahl, M. & Medema, R. H. FoxM1: At the crossroads of ageing and cancer. *Biochim. Biophys. Acta - Rev. Cáncer* **1775**, 92–102 (2007).
90. Raychaudhuri, P. & Park, H. J. FoxM1: A Master Regulator of Tumor Metastasis. *Cáncer Res.* **71**, 4329–4333 (2011).
91. Wierstra, I. *FOXM1 (Forkhead box M1) in tumorigenesis. Overexpression in human cancer, implication in tumorigenesis, oncogenic functions, tumor-suppressive properties, and target of anticancer therapy. Advances in Cáncer Research* **119**, (Elsevier Inc., 2013).
92. Dai, B. *et al.* Aberrant FoxM1B expression increases matrix metalloproteinase-2 transcription and enhances the invasion of glioma cells. *Oncogene* **26**, 6212–6219 (2007).

Referencias

93. Chandran, U. R. *et al.* Gene expression profiles of prostate cancer reveal involvement of multiple molecular pathways in the metastatic process. *BMC Cáncer* **7**, 64 (2007).
94. Wang, I.-C. *et al.* FoxM1 Regulates Transcription of *JNK1* to Promote the G₁/S Transition and Tumor Cell Invasiveness. *J. Biol. Chem.* **283**, 20770–20778 (2008).
95. CHEN, H., ZOU, Y., YANG, H., WANG, J. & PAN, H. Downregulation of FoxM1 inhibits proliferation, invasion and angiogenesis of HeLa cells in vitro and in vivo. *Int. J. Oncol.* **45**, 2355–2364 (2014).
96. Liu, D., Zhang, Z. & Kong, C. High FOXM1 expression was associated with bladder carcinogenesis. *Tumor Biol.* **34**, 1131–1138 (2013).
97. Gormally, M. V. *et al.* Suppression of the FOXM1 transcriptional programme via novel small molecule inhibition. *Nat. Commun.* **5**, 5165 (2014).
98. Martin, J. M. & Goldstein, L. J. Profile of abemaciclib and its potential in the treatment of breast cancer. *Onco. Targets. Ther.* **11**, 5253–5259 (2018).
99. Finn, R. S. *et al.* Palbociclib and Letrozole in Advanced Breast Cancer. *N. Engl. J. Med.* **375**, 1925–1936 (2016).
100. Cristofanilli, M. *et al.* Fulvestrant plus palbociclib versus fulvestrant plus placebo for treatment of hormone-receptor-positive, HER2-negative metastatic breast cancer that progressed on previous endocrine therapy (PALOMA-3): final analysis of the multicentre, double-blind, phase 3 randomised controlled trial. *Lancet Oncol.* **17**, 425–439 (2016).
101. Rocca, A. *et al.* Progress with palbociclib in breast cancer: latest evidence and clinical considerations. *Ther. Adv. Med. Oncol.* **9**, 83–105 (2017).
102. Finn, R. S. *et al.* PD 0332991, a selective cyclin D kinase 4/6 inhibitor, preferentially inhibits proliferation of luminal estrogen receptor-positive

- human breast cancer cell lines in vitro. *Breast Cancer Res.* **11**, R77 (2009).
103. Qin, G. *et al.* Palbociclib inhibits epithelial-mesenchymal transition and metastasis in breast cancer via c-Jun/COX-2 signaling pathway. *Oncotarget* **6**, 41794–808 (2015).
 104. Tripathy, D. *et al.* Ribociclib plus endocrine therapy for premenopausal women with hormone-receptor-positive, advanced breast cancer (MONALEESA-7): a randomised phase 3 trial. *Lancet. Oncol.* **19**, 904–915 (2018).
 105. Tate, S. C. *et al.* A Population Pharmacokinetic and Pharmacodynamic Analysis of Abemaciclib in a Phase I Clinical Trial in Cancer Patients. *Clin. Pharmacokinet.* **57**, 335–344 (2018).
 106. Robert, M. *et al.* Pharmacokinetic drug evaluation of abemaciclib for advanced breast cancer. *Expert Opin. Drug Metab. Toxicol.* **15**, 85–91 (2019).
 107. Corona, S. P. & Generali, D. Abemaciclib: a CDK4/6 inhibitor for the treatment of HR+/HER2- advanced breast cancer. *Drug Des. Devel. Ther.* **12**, 321–330 (2018).
 108. Bisi, J. E., Sorrentino, J. A., Roberts, P. J., Tavares, F. X. & Strum, J. C. Preclinical Characterization of G1T28: A Novel CDK4/6 Inhibitor for Reduction of Chemotherapy-Induced Myelosuppression. *Mol. Cancer Ther.* **15**, 783–93 (2016).
 109. Earl, J. *et al.* The UBC-40 Urothelial Bladder Cancer cell line index: A genomic resource for functional studies. *BMC Genomics* **16**, (2015).
 110. Chou, T.-C. Theoretical basis, experimental design, and computerized simulation of synergism and antagonism in drug combination studies. *Pharmacol. Rev.* **58**, 621–81 (2006).
 111. Chou, T. C. Drug combination studies and their synergy quantification using

Referencias

- the chou-talalay method. *Cáncer Res.* **70**, 440–446 (2010).
112. Chou, T. C. & Talalay, P. Quantitative analysis of dose-effect relationships: the combined effects of multiple drugs or enzyme inhibitors. *Adv. Enzyme Regul.* **22**, 27–55 (1984).
 113. Owczarek, T. B. *et al.* ARF Confers a Context-Dependent Response to Chemotherapy in Muscle-Invasive Bladder Cáncer. *Cáncer Res.* **77**, 1035–1046 (2017).
 114. Fry, D. W. *et al.* Specific inhibition of cyclin-dependent kinase 4/6 by PD 0332991 and associated antitumor activity in human tumor xenografts. *Mol. Cáncer Ther.* **3**, 1427–38 (2004).
 115. Rubio, C. *et al.* Cdk4/6-inhibitor as a novel therapeutic approach for advanced Bladder Cáncer independently of RB1 status. *Clin. Cáncer Res.* clincanres.0685.2018 (2018). doi:10.1158/1078-0432.CCR-18-0685
 116. Ramírez, A., Bravo, A., Jorcano, J. L. & Vidal, M. Sequences 5' of the bovine keratin 5 gene direct tissue- and cell-type-specific expression of a lacZ gene in the adult and during development. *Differentiation* **58**, 53–64 (1994).
 117. Puzio-Kuter, A. M. *et al.* Inactivation of p53 and Pten promotes invasive bladder cáncer. *Genes Dev.* **23**, 675–80 (2009).
 118. Santos, M. *et al.* In vivo disruption of an Rb-E2F-Ezh2 signaling loop causes bladder cáncer. *Cáncer Res.* **74**, 6565–6577 (2014).
 119. Soriano, P. Generalized lacZ expression with the ROSA26 Cre reporter strain. *Nat. Genet.* **21**, 70–71 (1999).
 120. Johnson, W. E., Li, C. & Rabinovic, A. Adjusting batch effects in microarray expression data using empirical Bayes methods. *Biostatistics* **8**, 118–127 (2007).

121. Saeed, A. I. *et al.* TM4: A Free, Open-Source System for Microarray Data Management and Analysis. *Biotechniques* **34**, 374–378 (2003).
122. Chen, E. Y. *et al.* Enrichr: interactive and collaborative HTML5 gene list enrichment analysis tool. *BMC Bioinformatics* **14**, 128 (2013).
123. Kuleshov, M. V. *et al.* Enrichr: a comprehensive gene set enrichment analysis web server 2016 update. *Nucleic Acids Res.* **44**, W90–W97 (2016).
124. Subramanian, A. *et al.* Gene set enrichment analysis: A knowledge-based approach for interpreting genome-wide expression profiles. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **102**, 15545–15550 (2005).
125. VanArsdale, T., Boshoff, C., Arndt, K. T. & Abraham, R. T. Molecular pathways: Targeting the cyclin D-CDK4/6 axis for cancer treatment. *Clin. Cancer Res.* **21**, 2905–2910 (2015).
126. Guarducci, C. *et al.* Cyclin E1 and Rb modulation as common events at time of resistance to palbociclib in hormone receptor-positive breast cancer. *npj Breast Cancer* **4**, 38 (2018).
127. Sanders, D. A. *et al.* FOXM1 binds directly to non-consensus sequences in the human genome. *Genome Biol.* **16**, 130 (2015).
128. M-M Kwok, J. *et al.* Cell Cycle, Cell Death, and Senescence FOXM1 Confers Acquired Cisplatin Resistance in Breast Cancer Cells. (2010). doi:10.1158/1541-7786.MCR-09-0432
129. Tassi, R. A. *et al.* FOXM1 expression is significantly associated with chemotherapy resistance and adverse prognosis in non-serous epithelial ovarian cancer patients. doi:10.1186/s13046-017-0536-y
130. Puzio-Kuter, A. M. *et al.* Inactivation of p53 and Pten promotes invasive bladder cancer. *Genes Dev.* **23**, 675–680 (2009).

Referencias

131. Ruiz, S. *et al.* Unique and overlapping functions of pRb and p107 in the control of proliferation and differentiation in epidermis. *Development* **131**, 2737–2748 (2004).
132. Witjes, J. A. *et al.* EAU Guidelines on Muscle-invasive and Metastatic Bladder Cáncer: Summary of the 2013 Guidelines. *Eur. Urol.* **65**, 778–792 (2014).
133. Bellmunt, J., Powles, T. & Vogelzang, N. J. A review on the evolution of PD-1/PD-L1 immunotherapy for bladder cáncer: The future is now. *Cáncer Treat. Rev.* **54**, 58–67 (2017).
134. Clark, A. S. *et al.* Palbociclib (PD0332991)-a Selective and Potent Cyclin-Dependent Kinase Inhibitor: A Review of Pharmacodynamics and Clinical Development. *JAMA Oncol.* **2**, 1–8 (2015).
135. Malorni, L. *et al.* Palbociclib as single agent or in combination with the endocrine therapy received before disease progression for estrogen receptor-positive, HER2-negative metastatic breast cáncer: TREnd trial. *Ann. Oncol.* **29**, 1748–1754 (2018).
136. Sedlacek, H. *et al.* Flavopiridol (L86 8275; NSC 649890), a new kinase inhibitor for tumor therapy. *Int. J. Oncol.* **9**, 1143–68 (1996).
137. Asghar, U., Witkiewicz, A. K., Turner, N. C. & Knudsen, E. S. The history and future of targeting cyclin-dependent kinases in cáncer therapy. *Nat. Rev. Drug Discov.* **14**, 130–46 (2015).
138. Parry, D. *et al.* Dinaciclib (SCH 727965), a Novel and Potent Cyclin-Dependent Kinase Inhibitor. *Mol. Cáncer Ther.* **9**, 2344–2353 (2010).
139. Mita, M. M. *et al.* Randomized Phase II Trial of the Cyclin-Dependent Kinase Inhibitor Dinaciclib (MK-7965) Versus Capecitabine in Patients With Advanced Breast Cáncer. *Clin. Breast Cáncer* **14**, 169–176 (2014).
140. Toogood, P. L. *et al.* Discovery of a Potent and Selective Inhibitor of Cyclin-

- Dependent Kinase 4/6. *J. Med. Chem.* **48**, 2388–2406 (2005).
141. Fry, D. W. *et al.* Specific inhibition of cyclin-dependent kinase 4/6 by PD 0332991 and associated antitumor activity in human tumor xenografts. *Mol. Cáncer Ther.* **3**, 1427–38 (2004).
 142. Dean, J. L., Thangavel, C., McClendon, A. K., Reed, C. A. & Knudsen, E. S. Therapeutic CDK4/6 inhibition in breast cáncer: key mechanisms of response and failure. *Oncogene* **29**, 4018–4032 (2010).
 143. Rivadeneira, D. B. *et al.* Proliferative Suppression by CDK4/6 Inhibition: Complex Function of the Retinoblastoma Pathway in Liver Tissue and Hepatoma Cells. *Gastroenterology* **138**, 1920–1930.e2 (2010).
 144. Sage, J., Miller, A. L., Pérez-Mancera, P. A., Wysocki, J. M. & Jacks, T. Acute mutation of retinoblastoma gene function is sufficient for cell cycle re-entry. *Nature* **424**, 223–228 (2003).
 145. Thangavel, C. *et al.* Therapeutic Challenge with a CDK 4/6 Inhibitor Induces an RB-Dependent SMAC-Mediated Apoptotic Response in Non-Small Cell Lung Cáncer. *Clin. Cáncer Res.* **24**, 1402–1414 (2018).
 146. Wang, H. *et al.* The metabolic function of cyclin D3-CDK6 kinase in cáncer cell survival. *Nature* **546**, 426–430 (2017).
 147. Wilson, M. S. C., Brosens, J. J., Schwenen, H. D. C. & Lam, E. W.-F. FOXO and FOXM1 in cáncer: the FOXO-FOXM1 axis shapes the outcome of cáncer chemotherapy. *Curr. Drug Targets* **12**, 1256–66 (2011).
 148. Koo, C.-Y., Muir, K. W. & Lam, E. W.-F. FOXM1: From cáncer initiation to progression and treatment. *Biochim. Biophys. Acta - Gene Regul. Mech.* **1819**, 28–37 (2012).
 149. Li, L., Wu, D., Yu, Q., Li, L. & Wu, P. Prognostic value of FOXM1 in solid tumors: a systematic review and meta-analysis. *Oncotarget* **8**, 32298–32308

Referencias

(2017).

150. Wang, I.-C. *et al.* FoxM1 regulates transcription of JNK1 to promote the G1/S transition and tumor cell invasiveness. *J. Biol. Chem.* **283**, 20770–8 (2008).
151. Pignot, G. *et al.* Hedgehog pathway activation in human transitional cell carcinoma of the bladder. *Br. J. Cáncer* **106**, 1177–1186 (2012).
152. Kim, S.-K. *et al.* Expression Signature Defined by FOXM1–CCNB1 Activation Predicts Disease Recurrence in Non–Muscle-Invasive Bladder Cáncer. *Clin. Cáncer Res.* **20**, (2014).
153. Yang, C. *et al.* Inhibition of FOXM1 transcription factor suppresses cell proliferation and tumor growth of breast cáncer. *Cáncer Gene Ther.* **20**, 117–124 (2013).
154. Kwok, J. M.-M. *et al.* Thiostrepton selectively targets breast cáncer cells through inhibition of forkhead box M1 expression. *Mol. Cáncer Ther.* **7**, 2022–2032 (2008).
155. Hegde, N. S., Sanders, D. A., Rodriguez, R. & Balasubramanian, S. The transcription factor FOXM1 is a cellular target of the natural product thiostrepton. *Nat. Chem.* **3**, 725–731 (2011).
156. Kalinichenko, V. V. *et al.* Foxm1b transcription factor is essential for development of hepatocellular carcinomas and is negatively regulated by the p19ARF tumor suppressor. *Genes Dev.* **18**, 830–850 (2004).
157. Gusarova, G. A. *et al.* A cell-penetrating ARF peptide inhibitor of FoxM1 in mouse hepatocellular carcinoma treatment. *J. Clin. Invest.* **117**, 99–111 (2007).
158. Wang, Y. *et al.* FoxM1 expression is significantly associated with cisplatin-based chemotherapy resistance and poor prognosis in advanced non-small cell lung cáncer patients. *Lung Cáncer* **79**, 173–179 (2013).

159. Kwok, J. M.-M. *et al.* FOXM1 confers acquired cisplatin resistance in breast cancer cells. *Mol. Cancer Res.* **8**, 24–34 (2010).
160. Zhou, J. *et al.* FOXM1 Modulates Cisplatin Sensitivity by Regulating EXO1 in Ovarian Cancer. *PLoS One* **9**, e96989 (2014).
161. Kelland, L. The resurgence of platinum-based cancer chemotherapy. *Nat. Rev. Cancer* **7**, 573–584 (2007).
162. McShane, T. M., Wolfe, T. A. & Ryan, J. C. Updates on managing advanced breast cancer with palbociclib combination therapy. *Ther. Adv. Med. Oncol.* **10**, 175883591879384 (2018).
163. Gao, Y. *et al.* Inhibition of CDK4 sensitizes multidrug resistant ovarian cancer cells to paclitaxel by increasing apoptosis. *Cell. Oncol.* **40**, 209–218 (2017).
164. Dean, J. L., Kathleen McClendon, A. & Knudsen, E. S. Modification of the DNA Damage Response by Therapeutic CDK4/6 Inhibition. (2012). doi:10.1074/jbc.M112.365494
165. Franco, J., Witkiewicz, A. . K. & Knudsen, E. S. CDK4/6 inhibitors have potent activity in combination with pathway selective therapeutic agents in models of pancreatic cancer. *Oncotarget* **5**, 6512–25 (2014).
166. Konecny, G. E. *et al.* Expression of p16 and Retinoblastoma Determines Response to CDK4/6 Inhibition in Ovarian Cancer. *Clin. Cancer Res.* **17**, 1591–1602 (2011).
167. Okada, K. *et al.* Overexpression of Forkhead Box M1 Transcription Factor (FOXM1) is a Potential Prognostic Marker and Enhances Chemoresistance for Docetaxel in Gastric Cancer. *Ann. Surg. Oncol.* **20**, 1035–1043 (2013).
168. Chiu, W.-T. *et al.* FOXM1 confers to epithelial-mesenchymal transition, stemness and chemoresistance in epithelial ovarian carcinoma cells. *Oncotarget* **6**, 2349–65 (2015).

Referencias

169. Engel, B. E., Cress, W. D. & Santiago-Cardona, P. G. THE RETINOBLASTOMA PROTEIN: A MASTER TUMOR SUPPRESSOR ACTS AS A LINK BETWEEN CELL CYCLE AND CELL ADHESION. *Cell Health Cytoskelet.* **7**, 1–10 (2015).
170. Costa, C. *et al.* A novel tumor suppressor network in squamous malignancies. *Sci. Rep.* **2**, (2012).
171. Mao, J.-H. *et al.* Genetic interactions between Pten and p53 in radiation-induced lymphoma development. *Oncogene* **22**, 8379–8385 (2003).
172. Chen, Z. *et al.* Crucial role of p53-dependent cellular senescence in suppression of Pten-deficient tumorigenesis. *Nature* **436**, 725–730 (2005).
173. Zheng, H. *et al.* p53 and Pten control neural and glioma stem/progenitor cell renewal and differentiation. *Nature* **455**, 1129–1133 (2008).
174. Hambardzumyan, D. *et al.* PI3K pathway regulates survival of cancer stem cells residing in the perivascular niche following radiation in medulloblastoma in vivo. *Genes Dev.* **22**, 436–448 (2008).
175. Paramio, J. M., Navarro, M., Segrelles, C., Gómez-Casero, E. & Jorcano, J. L. PTEN tumour suppressor is linked to the cell cycle control through the retinoblastoma protein. *Oncogene* **18**, 7462–7468 (1999).
176. García-Escudero, R. *et al.* Gene expression profiling of mouse p53-deficient epidermal carcinoma defines molecular determinants of human cancer malignancy. *Mol. Cáncer* **9**, 193 (2010).
177. Cordon-Cardo, C. Molecular alterations associated with bladder cancer initiation and progression. *Scand. J. Urol. Nephrol.* **42**, 154–165 (2008).
178. Knowles, M. A. Bladder cancer subtypes defined by genomic alterations. *Scand. J. Urol. Nephrol.* **42**, 116–130 (2008).

179. Wu, X.-R. Biology of urothelial tumorigenesis: insights from genetically engineered mice. *Cáncer Metastasis Rev.* **28**, 281–90 (2009).
180. He, F. *et al.* Deficiency of pRb family proteins and p53 in invasive urothelial tumorigenesis. *Cáncer Res.* **69**, 9413–21 (2009).
181. Kamat, A. M. *et al.* Bladder cáncer. *Lancet* **388**, 2796–2810 (2016).
182. Hedegaard, J. *et al.* Comprehensive Transcriptional Analysis of Early-Stage Urothelial Carcinoma. *Cáncer Cell* **30**, 27–42 (2016).
183. Martínez-Fernández, M. *et al.* A Polycomb-mir200 loop regulates clinical outcome in bladder cáncer. *Oncotarget* **6**, 42258–75 (2015).
184. Coe, B. P. *et al.* Genomic Deregulation of the E2F/Rb Pathway Leads to Activation of the Oncogene EZH2 in Small Cell Lung Cáncer. *PLoS One* **8**, e71670 (2013).
185. Bracken, A. P. *et al.* EZH2 is downstream of the pRB-E2F pathway, essential for proliferation and amplified in cáncer. *EMBO J.* **22**, 5323–5335 (2003).
186. Schaer, D. A. *et al.* The CDK4/6 Inhibitor Abemaciclib Induces a T Cell Inflamed Tumor Microenvironment and Enhances the Efficacy of PD-L1 Checkpoint Blockade. *Cell Rep.* **22**, 2978–2994 (2018).
187. Goel, S. *et al.* CDK4/6 inhibition triggers anti-tumour immunity. doi:10.1038/nature23465
188. Aggen, D. H. & Drake, C. G. Biomarkers for immunotherapy in bladder cáncer: a moving target. *J. Immunother. Cáncer* **5**, 94 (2017).

ANEXOS

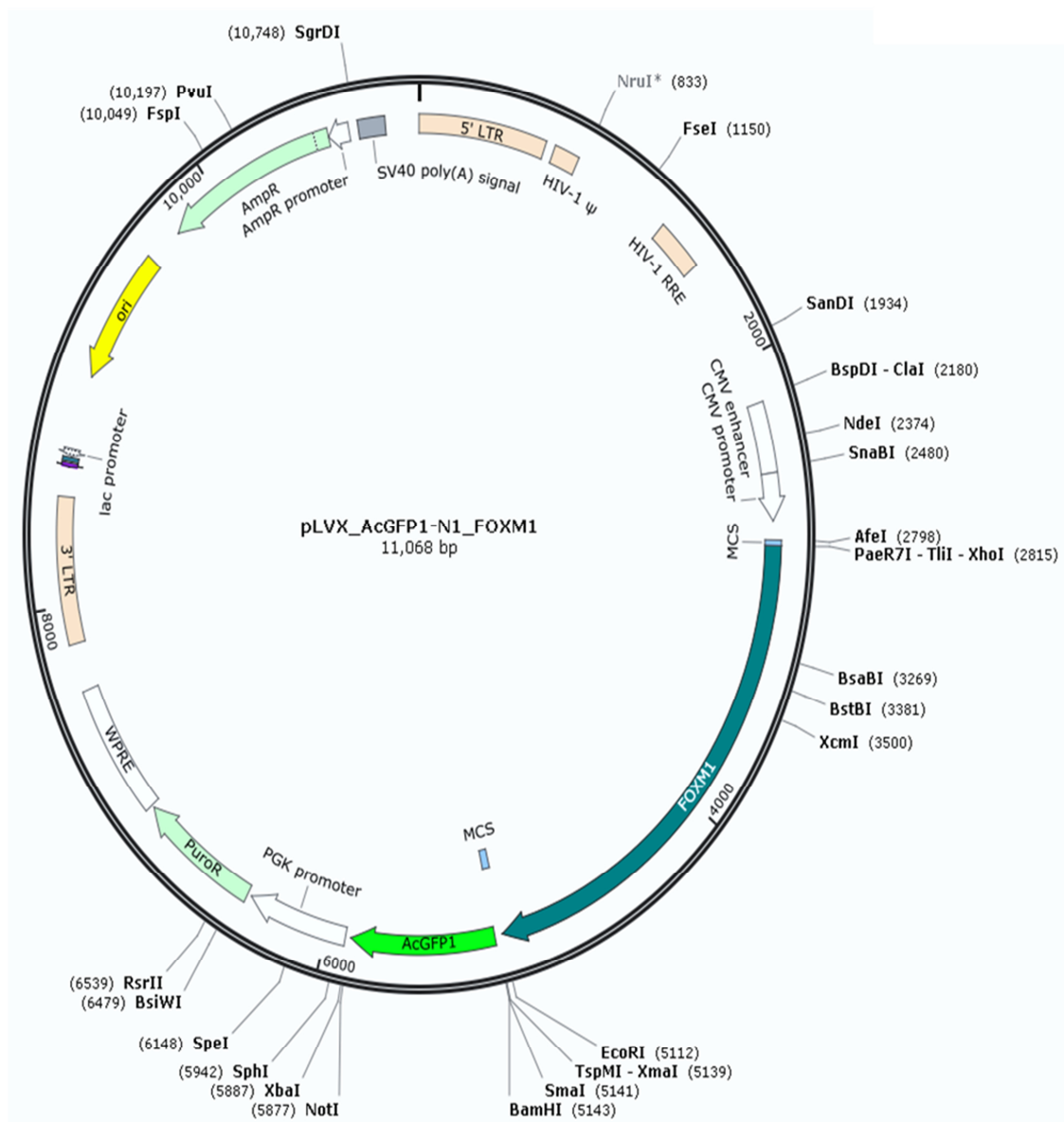


Anexos

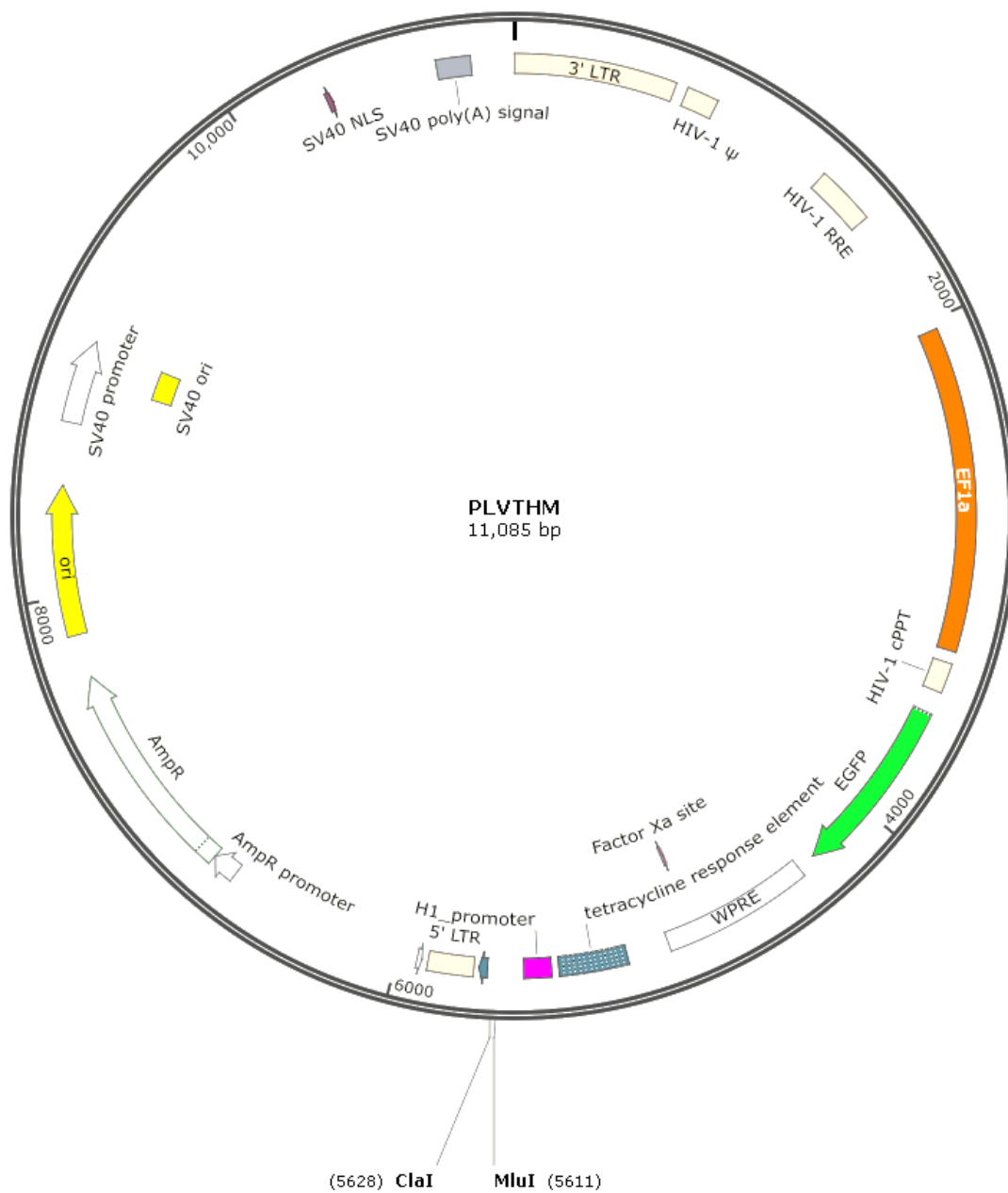
Pacientes (n)	87
Edad media (Rango)	72 años (49–90)
Sexo	M=68
	F=19
Estatus de Fumador	No=15
	Actualmente fumador=27
	Ex-fumador=43
	ND=2
Estadificación tumoral	Papiloma =1
	Ta=40
	T1=36
	T2=10
Grado	ND =1
	Bajo=45
	Alto=37
	NUPBPM =4
Alteraciones en mucosa normal	Displasia=6
	Metaplasia=1
	Cistitis Glandular =1
Instilaciones Vesicales	ND=23
	Sí=15 (14 BCG; 1 mitomicina)
	No=52
Seguimiento, media (rango)	864d (34-1123)
Tamaño tumoral, media (rango)	2 cm (0,5-7)
Número de tumores, media (rango)	1 (1-10)
Eventos de Recurrencia	ND = 11
	Recurrencia=43 No recurrencia=33
Estadio de la recurrencia	Ta=12
	T1=12
	T2=3
	ND=1
Grado de la recurrencia	Bajo=12
	Alto=12
	NUPBPM =1
	CIS=2
	ND=6

Anexo I. Parámetros clínicos y valoraciones de tinciones inmunohistoquímicas de las muestras de tumores de mama humanos.

ND= No Determinado; NUPBPM=Neoplasia urotelial papilar de bajo potencial maligno; CIS= carcinoma plano in situ.



Anexo II. Mapa del plásmido utilizado para la sobreexpresión recombinante de FOXM1. Proporcionado por el Dr. Gandarillas (IDIVAL, Santander, España).



Anexo III. Mapa del plásmido lentiviral de segunda generación utilizado para el silenciamiento de CDK2, CDK4 y pRB1 de FOXM1. Proporcionado por el Dr. Ruiz (CNIO, Madrid, España).

CDK4/6 Inhibitor as a Novel Therapeutic Approach for Advanced Bladder Cancer Independently of *RB1* Status



Carolina Rubio^{1,2}, Mónica Martínez-Fernández^{1,2,3}, Cristina Segovia^{1,2,3}, Iris Lodewijk^{1,3}, Cristian Suarez-Cabrera¹, Carmen Segrelles^{1,2,3}, Fernando López-Calderón³, Ester Munera-Maravilla^{1,3}, Mirentxu Santos^{1,2,3}, Alejandra Bernardini^{1,2,3}, Ramón García-Escudero^{1,2,3}, Corina Lorz^{1,2,3}, Maria José Gómez-Rodríguez^{1,2}, Guillermo de Velasco¹, Irene Otero¹, Felipe Villacampa^{1,2}, Felix Guerrero-Ramos¹, Sergio Ruiz⁴, Federico de la Rosa^{1,2}, Sara Domínguez-Rodríguez⁵, Francisco X. Real^{2,6,7}, Núria Malats^{2,5}, Daniel Castellano^{1,2}, Marta Dueñas^{1,2,3}, and Jesus M. Paramio^{1,2,3}

Abstract

Purpose: Bladder cancer is a clinical and social problem due to its high incidence and recurrence rates. It frequently appears in elderly patients showing other medical comorbidities that hamper the use of standard chemotherapy. We evaluated the activity of CDK4/6 inhibitor as a new therapy for patients unfit for cisplatin (CDDP).

Experimental Design: Bladder cancer cell lines were tested for *in vitro* sensitivity to CDK4/6 inhibition. A novel metastatic bladder cancer mouse model was developed and used to test its *in vivo* activity.

Results: Cell lines tested were sensitive to CDK4/6 inhibition, independent on *RB1* gene status. Transcriptome analyses and knockdown experiments revealed a major role for FOXM1 in this response. CDK4/6 inhibition resulted in reduced FOXM1 phosphorylation *in vitro* and *in vivo* and showed synergy with CDDP, allowing a significant tumor regression. FOXM1 exerted important oncogenic roles in bladder cancer.

Conclusions: CDK4/6 inhibitors, alone or in combination, are a novel therapeutic strategy for patients with advanced bladder cancer previously classified as unfit for current treatment options. *Clin Cancer Res*; 1–13. ©2018 AACR.

Introduction

Bladder cancer is the most common malignancy of the urinary tract (1). At diagnosis, two major classes of bladder cancer are distinguished (2): approximately 75% of patients present a non-muscle-invasive disease (NMIBC, stage Ta, T1 or CIS), while the

rest of the patients (25%) show a tumor already invading the muscle layers (MIBC stage T2 or higher). NMIBC is considered a relatively indolent tumor, and treated by transurethral resection (3). In the case of high-risk tumors, this can be followed by intravesical instillation with Bacillus Calmette-Guérin or mitomycin (3). Nevertheless, NMIBC displays one of the highest recurrence rates among all cancers, and a significant part of these recurrences shows tumor progression toward MIBC (4). The treatment of MIBC includes a radical cystectomy usually followed by cisplatin (CDDP)-based chemotherapy (5). Unfortunately, the disease becomes metastatic in a high proportion of the cases (50%–70%), leading to extremely low survival rates (5, 6). This scenario aggravates when considering the elevated mean age of patients at diagnosis, associated to frequent and severe comorbidities in almost 50% of patients with MIBC (6). Such patients, often called "unfit", are not candidates to CDDP treatment having few therapeutic options (6). In spite of multiple trials aimed to develop new therapeutic options for patients with bladder cancer, few improvements have occurred in the last decades with the exception of immune checkpoint inhibitors. In this regard, although these inhibitors have demonstrated promising results in some cases, the proportion of patients who shows objective responses to these therapies is still very limited (20%–35%; refs. 7–9). Consequently, there is an urgent need of new avenues for the management of advanced bladder cancer.

The molecular portrait of bladder cancer has identified multiple alterations that could be actionable through

¹Biomedical Research Institute, University Hospital "12 de Octubre," Madrid, Spain. ²Centro de Investigación Biomédica en Red de Cáncer (CIBERONC), Madrid, Spain. ³Molecular Oncology Unit, CIEMAT, Madrid, Spain. ⁴Genomic Instability Group, CNIO, Madrid, Spain. ⁵Genetic & Molecular Epidemiology Group, CNIO, Madrid, Spain. ⁶Epithelial Carcinogenesis Group, CNIO, Madrid, Spain. ⁷Departament de Ciències Experimentals i de la Salut, Universitat Pompeu Fabra, Barcelona, Spain.

Note: Supplementary data for this article are available at Clinical Cancer Research Online (<http://clincancerres.aacrjournals.org/>).

C. Rubio and M. Martínez-Fernández contributed equally to this article.

Current address for M. Martínez-Fernández: Mobile Genomes and Disease Lab, CIMUS, Universidade de Santiago de Compostela, Barcelona, Spain; current address for F. Villacampa, Urology Department, Clínica Universidad de Navarra, Madrid, Spain; and current address for S. Ruiz, Laboratory of Genome Integrity, NCI, NIH, Bethesda, Maryland.

Corresponding Author: Jesus M. Paramio, Molecular Oncology Unit, CIEMAT, Avd Complutense 40, Madrid E-28040, Spain. Phone: 349-1496-2517; Fax: 349-1346-6484; E-mail: jesusm.paramio@ciemat.es

doi: 10.1158/1078-0432.CCR-18-0685

©2018 American Association for Cancer Research.

